UNTERSUCHUNGEN ZUR STEROIDFÜHRUNG VON CALLUSKULTUREN UND SAMEN VON SOLANUM DULCAMARA L.

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

SIBYLLE MAY

aus Siegen/Westf.

Düsseldorf

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544328_0005

UNTERSUCHUNGEN ZUR STEROIDFÜHRUNG VON CALLUSKULTUREN UND SAMEN VON SOLANUM DULCAMARA L.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sibylle May

aus Siegen/Westf.

Düsseldorf

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Professor Dr. O. Hess

Referent : Professor Dr. G. Willuhn

Korreferent : Professor Dr. R.G. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung : 31.10.1979

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Willuhn am Pharmakognostischen Institut der J.W.Goethe - Universität in Frankfurt a.M. begonnen und am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf weitergeführt und beendet.

Meinem Doktorvater,

Herrn Professor Dr. G. Willuhn,

danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine stets freundliche und hilfreiche Betreuung, sowie die Grosszügigkeit, mit der er meine Arbeit unterstützt und gefördert hat.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung und Problemstellung 1

B. Allgemeiner Teil

I. Bisherige Untersuchungen zur Steroidführung von Solanum dulcamara L. 8

II. Bisherige Untersuchungen zur Steroidführung pflanzlicher Zellkulturen 15

C. Spezieller Teil

I. Installierung der Calluskulturen von Solanum dulcamara L. 24

1. Material und Methoden 24

1.1. Herkunft der Pflanzen 24

1.2. Ausgangsmaterial zur Installierung der Calluskulturen 25

1.3. Nährmedien 28

1.4. Kulturbedingungen 34

1.5. Bestimmung der Zuwachsrate 35

2. Versuche und Ergebnisse zur Calluskultur 36

2.1. Initialkulturen 36

2.1.1. IES/Kinetin - Kombinationen 37

2.1.2. NES/Kinetin - Kombinationen 38

2.1.3. 2,4 - D/Kinetin - Kombinationen 39

2.1.4. Zugabe von Kokosmilch zur Callusinduktion 43

2.1.5. Callusbildung aus Keimlingsorganen 45

2.1.6. Zusammenfassung 46

2.2. Versuche zur Optimierung des Callus-wachstums 48

2.2.1. Soladulcidin - Sippe 48

2.2.1.1. Ergänzung des Nährmediums mit Vitaminen und Gibberellinsäure GA_3 48

2.2.1.2. Calluswachstum und -entwicklung unter 52

Seite

veränderten Lichtbedingungen

2.2.1.3. Mutationen und Produktion von Callusgewebe 53

2.2.2. Solasodin - Sippe 58

2.2.3. Zusammenfassung 61

II. Untersuchungen zur Steroidführung des Callusgewebes 63

1. Isolierung und Identifizierung der Triterpenoide und Sterine 63

1.1. Dc Nachweis von Sterinestern sowie freien Triterpenoiden und Sterinen im Petroläther-extrakt und seinem unverseifbaren Anteil 63

1.2. Säulenchromatographische Auftrennung des unverseifbaren Anteiles des Petroläther-extraktes 66

1.3. Isolierung und gc Analyse der Triterpene 67

1.4. Identifizierung der Sterine 70

1.5. Qualitative Zusammensetzung der ungebundenen Sterine im Callus 80

1.6. Nachweis von Steringlykosiden und Acyl - Steringlykosiden im Callus 81

1.7. Quantitative Zusammensetzung der aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes isolierten Sterine sowie der frei, als Glykoside und Acyl - Glykoside im Callus vorliegenden Sterine 89

1.8. Quantitative Bestimmung der Gesamtsterine sowie des Anteiles der frei,verestert und glykosidisch gebunden vorliegenden Sterine im Callus 91

2. Dc Nachweis von Steroidsapogeninen und -alkaloiden im Callusgewebe 94

3. Diskussion der Ergebnisse zur Steroidbildung der Calluskulturen von S. dulcamara L. 100

III. Untersuchungen zur Steroidführung des Samens 111

Seite

2.4.1. Geräte 166
2.4.2. Gaschromatographische Trennsysteme 166
2.4.2.1. Gaschromatographie der Triterpene und Sterine 167
2.4.2.2. Gaschromatographie der Fettsäuren 167
2.5. Herstellung der zur Identifizierung benötigten Derivate 168
2.5.1. Acetatbildung 168
2.5.2. Bildung der Methylester 168
3. Der Samen 169
3.1. Herkunft der Samen und Herstellung des Petrolätherextraktes 169
3.2. Gewinnung des basischen Gesamt - Steroidglykosidextraktes 169
3.2.1. Gewinnung der basischen Steroidaglyka 170
3.3. Gewinnung der neutralen Steroidglykoside 171
3.3.1. Säulenchromatographische Abtrennung der Steroidsapogenine 172
3.3.2. Schichtchromatographische Reinigung und präparative Auftrennung 173
3.4. Gewinnung der Sterinfraktion 174
3.4.1. Gewinnung des unverseifbaren Anteiles des Petrolätherextraktes 174
3.4.2. Gewinnung der freien und der verestert vorliegenden Sterine durch Säulenchromatographie 174
3.4.3. Isolierung der im Samen verestert vorliegenden Sterine 175
3.4.4. Isolierung der im Samen frei vorliegenden Sterine 176
3.4.5. Isolierung der Sterine aus dem Unverseifbaren des Petrolätherextraktes 177
3.5. Gewinnung der Triterpenfraktion aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes 177
4. Der Callus 178
4.1. Herstellung des Petrolätherextraktes 178

Seite

von S. dulcamara L.

1. Fraktionierte Extraktion des Samens zum Nachweis der Sterine sowie neutraler und basischer Steroidsapogenine 111

2. Dc Nachweis der neutralen Steroidsaponine und deren Aglyka 112

3. Isolierung und Identifizierung von Tigogenin und Diosgenin 115

4. Dc Nachweis von basischen Steroidglykosiden und deren Aglyka 119

4.1. Dc Nachweis basischer Steroidglykoside 119

4.2. Dc Nachweis der Aglyka Soladulcidin und Solasodin 123

5. Gc Analyse der Triterpene und Sterine des Samens 125

5.1. Identifizierung der Sterine 126

5.2. Identifizierung der Triterpene 131

6. Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse zur Steroidführung des Samens von S. dulcamara L. 133

IV. Die Fettsäuren in Samen und Callusgewebe 138

1. Die Fettsäuren des Samens 138

2. Die Fettsäuren des Callusgewebes 146

3. Diskussion und Zusammenfassung der Fettzusammensetzung des Samens und Callusgewebes von S. dulcamara L. 149

D. Zusammenfassung 152

E. Experimenteller Teil 157

1. Allgemeine Angaben 157

2. Chromatographische Methoden 157

2.1. Schichtchromatographie 157

2.2. Dünnschichtchromatographische Trennsysteme und Detektionsverfahren 159

2.3. Säulenchromatographie 166

2.4. Gaschromatographie 166

Seite

4.2. Gewinnung des unverseifbaren Anteiles des Petrolätherextraktes 179
4.3. Gewinnung der Sterin- und Triterpenfraktionen aus dem unverseifbaren Anteil 179
4.3.1. Isolierung der Triterpenfraktion 179
4.4. Gewinnung von Steringlykosiden und Acyl - Steringlykosiden 180
4.4.1. Gewinnung der Sterine,der Zucker- und der Fettsäurekomponente aus den Acyl - Steringlykosiden 181
4.4.2. Gewinnung der Sterine und der Zuckerkomponente der Steringlykoside 182
4.5. Quantitative Bestimmung der Sterine und Stederivate 182
4.5.1. Erstellung der Eichkurve 182
4.5.2. Bestimmung der Gesamtsterine 183
4.5.3. Bestimmung der freien Sterine und Sterinester 185
4.5.4. Bestimmung der Sterinester 185
4.6. Extraktion des Callus' zum dc Nachweis von Steroidalkaloiden und -sapogeninen 186
5. Gewinnung der Fettsäuren aus dem Petrolätherextrakt des Samens 187
5.1. Gewinnung der frei vorliegenden Fettsäuren 187
5.2. Gewinnung der gebunden vorliegenden Fettsäuren 188
5.3. Bildung der Hg(II) - acetat - Addukte 188
5.4. Spaltung der Hg(II) - acetat - Addukte 189
6. Gewinnung der Fettsäuren aus dem Petrolätherextrakt des Callus' 190
6.1. Gewinnung der frei vorliegenden Fettsäuren 190
6.2. Gewinnung der gebunden vorliegenden Fettsäuren 190

7. Literaturverzeichnis 191

A. Einleitung und Problemstellung

Der gesamte Zellverband einer höheren Pflanze geht aus der befruchteten Eizelle durch Mitosen und Differenzierung hervor.Dadurch hat jede Zelle den gleichen Genbestand wie die Zygote.Sie sollte aus diesem Grunde auch die gleichen Potenzen besitzen,d.h. sie müsste auch wie diese eine neue,intakte Pflanze bilden können.HABERLANDT hat bereits 1902 versucht,diese Omnipotenz der Zellen höherer Pflanzen zu beweisen,indem er Einzelzellen aus Blattgewebe,Mark- und Speicherparenchym sowie Haarzellen in Kultur nahm.Seinen Bemühungen war jedoch ein Misserfolg beschieden,der die Experimente zur Gewinnung von Zellkulturen pflanzlicher Provenienz für mehr als 30 Jahre stagnieren liess.Erst 1938 gelang es WHITE,GAUTHERET und NOBECOURT unabhängig voneinander,die Blockade der Information zur Teilungsfähigkeit in den differenzierten,spezialisierten Zellen durch den Einsatz von Wuchsstoffen zu beseitigen,diese Zellen zu reembryonalisieren und als nicht differenzierte Calluszellen unbegrenzt zu kultivieren.

Nach diesem Durchbruch wurden Calluskulturen von praktisch allen Teilen verschiedener Pflanzen angelegt,so von Wurzeln, Rhizomen,Blättern,Blütenblättern,Antheren,Pollen,Stempeln, Ovarien,Samen,Nucellus und Embryonengewebe.Bei einer derartigen Kultivierung von Zellen stellen jede Art - bei den

Kulturpflanzen sogar jede Sorte - sowie die einzelnen Organe an das jeweilige Nährmedium spezifische Ansprüche,die auch heute noch in umfangreichen Untersuchungen empirisch ermittelt werden müssen.Bei Kenntnis der Ernährungsansprüche dürfte es jedoch inzwischen möglich sein,von jeder gewünschten Pflanze Zellkulturen zu ziehen.Es ist auch mittlerweile gelungen,durch Veränderung der relativen Wuchsstoffkonzentrationen gezielt in den Regulationsmechanismus der kultivierten Calluszellen einzugreifen,diese zur Bildung von Wurzeln und Sprossen sowie zur Regeneration ganzer Pflanzen anzuregen,die bereits zu blühenden und fruchtenden,intakten Exemplaren weiterkultiviert worden sind. Das Konzept der Totipotenz ist damit bewiesen.
Mitte der fünfziger Jahre gelang es zum ersten Mal,Callusgewebe zum Zerfall in Einzelzellen bzw. kleine Zellaggregate zu bringen und diese wie Mikroorganismen in belüfteten und durchmischten Nährmedien zu ziehen.Callus- und Submerskulturen werden heute bei einer Reihe von Fragestellungen in der Grundlagenforschung der verschiedensten Bereiche (Wachstums- und Differenzierungsphysiologie,Stoffwechselphysiologie,Genetik,Membranologie) herangezogen.Auch in der angewandten Forschung,wie auf dem Gebiet der Nutz- und Zierpflanzenkultur,werden sie erfolgreich eingesetzt (u.a. KOBLITZ 1972;REUTHER 1975,1977;MURASHIGE 1974;MOSSNER u. CZYGAN 1978).Hier dienen Calluskulturen als Ausgangsmaterial für die vegetative Produktion dieser Pflanzen (z.B. Orchideen,Nelken,Pelargonien,Chrysanthemen,Gerbera,Iris',

Freesien).Bei einer Reihe von Nutzpflanzen ist es gelungen, auf dem Wege über Calli virus- und pilzfreie Pflanzen zu regenerieren (QUAK 1977).

Es eröffnen sich auch Möglichkeiten,die Zellkultur zur Züchtung von Kultur- und Arzneipflanzen mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Stoffproduktion,Resistenz u.a.m. einzusetzen.So konnten aus Pollen oder deren Bildungsgewebe in den Antheren haploide Gewebe und Pflanzen gezüchtet werden (s. MELCHERS 1975;MOSSNER u. CZYGAN 1978).Die haploiden,zuvor mutagen veränderten Gewebe lassen sich wieder diploidisieren und auf diesem Wege neue,homozygote Mutanten schneller als auf konventionellem Wege gewinnen.Noch weitergehende Möglichkeiten auf dem Gebiet der Zell- und Gewebekulturen eröffnet der relativ junge Forschungsbereich der Protoplastenkulturen und -fusionierungen.Hier ist es nicht nur gelungen,aus diesen "nackten" Zellen ganze Pflanzen zu regenerieren (TAKEBE et al. 1971;GRAMBOW et al. 1972;DURAND et al. 1973;BUI - DANG HA u. MACKENZIE 1973;KARTHA et al. 1974;DORION et al. 1975;VARDI et al. 1975),sondern auch, Protoplasten verschiedener Arten miteinander zu fusionieren und aus dem Fusionsprodukt intakte Pflanzen zu regenerieren (Beispiele bei MOSSNER u. CZYGAN 1978).Möglichkeiten wie Grenzen dieser somatischen Hybridisierungen für die Bildung von Homozygoten aus haploiden Protoplasten sind zur Zeit noch nicht abzusehen.Das gleiche gilt für die sich hierbei ergebenden Aspekte der Gen - Technologie,d.h. das Einschliessen fremder Nukleinsäuren in die Protoplasten sowie Versuche,

diese zur Expression zu bringen.

Weiterhin lag es nahe,Zellkulturen als Produzenten pharmazeutisch wichtiger und chemisch - synthetisch in wirtschaftlichem Massstab nicht zugänglicher Arzneistoffe einzusetzen. Ihre Bildung durch Suspensionskulturen würde gegenüber der Isolierung aus der entsprechenden Pflanze vielfältige Vorteile bringen.Die Probleme,die bei der Verwendung von Gewebekulturen als Produzenten von arzneilich verwendeten Sekundärstoffen auftreten,sind in den letzten Jahren in mehreren Zusammenfassungen diskutiert worden (u.a. CAREW u. STABA 1965;GRÜTZMANN 1966;REINHARD 1967,1975;BECKER 1969; TEUSCHER 1973;STECK u. CONSTABEL 1974;CZYGAN 1975,1976; BÖHM 1977;BUTCHER 1977).Gerade diese Übersichten zeigen, dass dieses Gebiet der angewandten Forschung erst am Anfang seiner Entwicklung steht und noch umfangreicher Grundlagenforschung bedarf.

Im Normalfall erfolgt in der intakten Pflanze die Bildung oder zumindest die Akkumulation von Sekundärstoffen erst, wenn das primäre Wachstum einen gewissen Abschluss gefunden hat und morphologische Differenzierungen eingetreten sind. Sekundärstoffe werden daher häufig nur in einem bestimmten Lebensabschnitt der Zelle gebildet und können zusätzlich an bestimmte Organe bzw. an ein Differenzierungsmuster der Zellen gebunden sein.Zunächst war umstritten,ob die in Zellkultur wachsenden,nicht differenzierten Zellen überhaupt in der Lage sind,unabhängig von der morphologischen Differenzierung Sekundärstoffe zu bilden.Inzwischen konnte jedoch

nachgewiesen werden,dass die Omnipotenz der Zellen auch im Bereich der Biosynthese sekundärer Pflanzenstoffe erhalten bleibt;es müssen nur die richtigen Bedingungen gefunden werden,diese Informationen abzurufen.
Die theoretischen Grundlagen für die Beantwortung vieler Fragen zur Sekundärstoffbildung in Zellkulturen sind noch nicht experimentell gesichert.Das Kernproblem der Produktion von Sekundärstoffen in Zellkulturen kann nur mit der Beantwortung der Frage gelöst werden,wie diese unabhängig von der morphologischen Differenzierung in den kultivierten Zellen abgerufen werden kann.Wenn es zutrifft,dass sowohl die morphologische als auch die biochemische Differenzierung auf dasselbe molekularbiologische Konzept zurückgeführt werden können,dann sollten alle Potentiale der Zellen in Zellkulturen nicht nur abrufbar sondern auch gezielt regulierbar sein.Hier fehlen jedoch noch grundlegende Kenntnisse über die Determinierungs- und Differenzierungsvorgänge in der Pflanze.

In der vorliegenden Arbeit sollen erstmals Calluskulturen von Solanum dulcamara L. mit folgenden Zielsetzung installiert werden :

1. Von S. dulcamara sind drei chemische Rassen bekannt,die genetisch fixiert in den oberirdischen vegetativen Organen nur eines der drei folgenden Steroidalkaloide Soladulcidin,Solasodin und Tomatidenol führen (s. Abb. 1,S. 10).In den anderen Organen ist diese chemische Differen-

zierung nicht so ausgeprägt bzw. nicht vorhanden (s. Abb. 2 und S. 12).Die Ursache dieser auffallenden qualitativen Unterschiede in der Steroidalkaloidführung der Blätter derselben Art ist unbekannt.Calluskulturen eröffnen hier als Modell die Möglichkeit,die Ursachen für die Reprimierung bestimmter Gene von einer neuen Seite zu untersuchen.Zu diesem Zweck sollen die optimalen Wachstumsbedingungen für eine Zellkultur dieser Art ermittelt werden.

2. Auch S. dulcamara führt als charakteristische Sekundärstoffe sowohl Steroidalkaloide als auch Steroidsaponine, die als Ausgangsstoffe für die industrielle Partialsynthese von Steroidhormonen herangezogen werden (KAUL et al. 1969;STOHS et al. 1975 b;CZYGAN 1975;MARSHALL u. STABA 1976;MOSSNER u. CZYGAN 1978).Es sollte deshalb geprüft werden,inwieweit S. dulcamara bereits unter den gewählten Bedingungen der Calluskultur in der Lage ist,diese Steroide zu bilden.

3. Die Untersuchung des biosynthetischen Potentials der Zellkulturen sollte des weiteren auf die biogenetischen Vorstufen der genannten Steroide,die Sterine,ausgedehnt werden.In der intakten Pflanze liegen diese sowohl frei als auch gebunden als Ester,Glykoside und Acyl - Glykoside vor (KÖSTENS u. WILLUHN 1973;WILLUHN u. KÖSTENS 1975).Sterine sind wiederholt in pflanzlichen Zellkul-

turen nachgewiesen worden,der Frage nach dem Vorliegen der genannten Derivate wurde hierbei jedoch nicht nachgegangen.Es sollte deshalb geprüft werden,inwieweit das Callusgewebe die Fähigkeit zur Bildung der genannten Sterinderivate aufrechterhalten hat.

4. In den letzten Jahren ist auch den aliphatischen Lipiden in pflanzlichen Zellkulturen Interesse entgegengebracht worden (MANGOLD 1977).Zusätzlich sollten deshalb die vom Callusgewebe synthetisierten Fettsäuren identifiziert werden,um auch dieses Potential mit dem der intakten Pflanze vergleichen zu können.

5. Von S. dulcamara sind die verschiedenen Organe hinsichtlich ihrer Steroidführung untersucht worden (s.S. 9 ff). Vom Samen liegen hierfür jedoch keine Analysen vor.Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit durch eine Untersuchung der Steroide des Samens das Bild der Steroidführung von S. dulcamara vervollständigt werden,das für eine Interpretation der Syntheseleistungen der Zellkulturen nützlich sein kann.

B. Allgemeiner Teil

I. Bisherige Untersuchungen zur Steroidführung von Solanum dulcamara L.

Der Bittersüsse Nachtschatten,Solanum dulcamara L. (Solanaceae) ist ein perennierender Halbstrauch der gemässigten Klimazonen.Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich im Süden bis nach Nordafrika,im Osten bis China und Japan (HEGI 1927).Die Volksmedizin setzte S. dulcamara zur Behandlung von Rheumatismus und Blasenkatarrh sowie gegen juckende Hautleiden ein.Die verholzten Stengel waren als Stipites Dulcamarae noch im Ergänzungsbuch zum DAB 6 (Erg.-B. 6) zu finden.

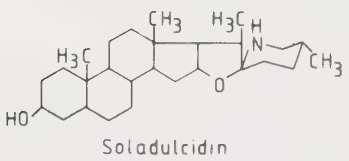
Ein phytochemisches Charakteristicum der Gattung Solanum, die mit ihren rund 1500 Arten eine der grössten Gattungen der Angiospermen darstellt,ist das Auftreten von Steroidalkaloidglykosiden.Sie sind die typischen Toxine der Solanum - Arten,die bei Wirbeltieren,Insekten und auch Mikroorganismen zu Vergiftungen führen können.Begleitet werden sie oft von den sauerstoffanalogen Steroidsaponinen.Beide Stoffgruppen stellen ein leicht zugängliches Ausgangsmaterial für die partialsynthetische Produktion therapeutisch verwendeter Steroidhormone dar (SYHORA et al. 1962;MANNING 1969;MATHE u. MATHE 1978).Diese Eigenschaft löste eine

systematische Suche nach neuen Vorkommen bereits bekannter Inhaltsstoffe sowie nach weiteren geeigneten Steroidkörpern für diese Partialsynthesen innerhalb der Gattung aus.Mit diesen Untersuchungen wurde gleichzeitig die Grundlage für eine chemotaxonomische Behandlung der Gattung Solanum gelegt (SANDER 1963 a),deren Systematik noch völlig unzureichend geklärt ist (s. DANERT 1970)

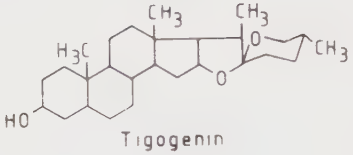
Die umfangreichen Analysen ergaben,dass sich von allen bisher untersuchten Solanum - Arten S. dulcamara durch eine stärkere chemische Differenzierung in der Steroidalkaloidführung unterscheidet.Hinsichtlich des Vorkommens dieser Stoffe in den oberirdischen vegetativen Organen sind von dieser Pflanze drei Chemovarianten bekannt geworden,die durch den Gehalt von jeweils nur einem der drei folgenden, als Glykoside vorliegenden Spirosolanole charakterisiert sind : Soladulcidin (25 R,5α H),Solasodin (25 R,Δ^5) und Tomatidenol (25 S,Δ^5).Begleitet werden diese Spirosolanole jeweils von den konfigurativ entsprechenden gesättigten oder ungesättigten Spirostanolen Tigogenin,Diosgenin oder Yamogenin,die ebenfalls glykosidisch gebunden vorliegen (s. Abb. 1).Die umfangreiche Literatur über die Steroidführung von S. dulcamara und ihre Variabilität ist kürzlich von MATHE u. MATHE (1978) zusammengefasst worden.

Durch Selbstungs- und Kreuzungsversuche konnte gezeigt werden,dass die chemische Differenzierung in den oberirdischen Organen genetisch fixiert ist (WILLUHN 1966;RÖNSCH et al. 1968).Das Vorkommen dieser drei Chemovarianten ist dabei

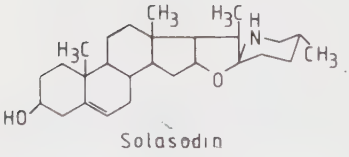
geographisch differenziert (SANDER 1963b;MATHE u. MATHE 1978) : die Tomatidenol - Sippe hat ihr Hauptverbreitungsgebiet in Westeuropa,die Soladulcidin - Sippe dagegen in



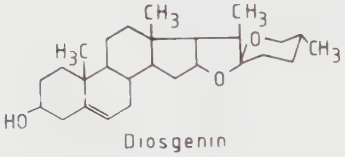
Soladulcidin



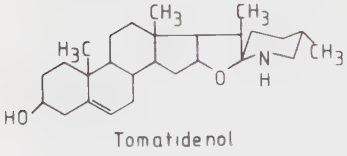
Tigogenin



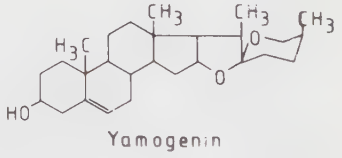
Solasodin



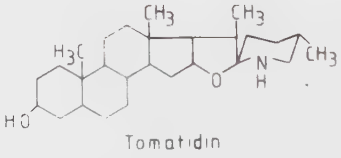
Diosgenin



Tomatidenol



Yamogenin



Tomatidin

Abbildung 1 : Die Spirosolanole und Spirostanole von S. dulcamara

Osteuropa.Die Grenze zwischen den beiden Verbreitungsarealen in Deutschland bildet etwa das Weser - Elb - Gebiet.Die Solasodin - Sippe tritt im Vergleich zu den beiden anderen in diesen Bezirken nur selten auf.Im Grenzgebiet zwischen den beiden Verbreitungsarealen existieren auch Populationen, deren Einzelpflanzen alle drei Steroidalkaloide gemeinsam führen (WILLUHN 1966).Vielfach tritt Solasodin in Spuren auch bei der Tomatidenol- und der Soladulcidin - Sippe auf.

In der Blüte (SANDER u. WILLUHN 1961) und in den unreifen Früchten wird neben den für die oberirdischen vegetativen Organe charakteristischen Steroidalkaloiden stets Solasodin in vergleichbaren Mengen synthetisiert (WILLUHN 1967,1968). Die Vermutung,Tomatidenol bzw. Soladulcidin könne aus den vegetativen Organen in die unreifen Früchte einwandern, konnte widerlegt werden (WILLUHN 1970).

In den Wurzeln der Tomatidenol - Sippe fanden RÖNSCH u. SCHREIBER (1966 a) neben Tomatidenol noch Soladulcidin und Solasodin sowie in der Soladulcidin - Sippe neben Soladulcidin noch Solasodin.Die Wurzeln beider Sippen enthielten darüberhinaus die 15α - Hydroxyverbindungen von Solasodin, Soladulcidin,Tomatidenol und Tomatidin.Diese vier 15α - Hydroxyderivate konnten von WILLUHN u. KUN - ANAKE (1970) auch in den Wurzeln der Solasodin - Sippe identifiziert werden,in der auch alle vier nicht am C-12 hydroxylierten Verbindungen gefunden wurden.

Abbildung 2 gibt die unterschiedliche Steroidalkaloidfüh-

rung in den Blättern,Wurzeln und Früchten der drei chemischen Sippen von S. dulcamara wieder.Die Ursache dieser auffallenden qualitativen Unterschiede in der Steroidalkaloidführung der Blätter derselben Art ist nicht bekannt.

Abbildung 2 : Die Steroidalkaloidführung in den Früchten, Blättern und Wurzeln der drei chemischen Sippen von S. dulcamara (I = Soladulcidin,II = Solasodin,III = Tomatidenol, IV = Tomatidin)

Von WILLUHN u. KÖSTENS (1974) wurden die Biosynthese - Vorstufen der Steroidalkaloide und -sapogenine,d.h. die Triterpene und Sterine von S. dulcamara analysiert.Aus den Blättern der Tomatidenol - Sippe isolierten die Autoren die Triterpenoide Cycloartenol,24 - Methylencycloartanol,Cycloeucalenol,Obtusifoliol,Lophenol,24 - Methylenlophenol und 24 - Äthylidenlophenol sowie die Sterine Cholesterin,Sitosterin,Stigmasterin,Campesterin,Brassicasterin,Isofucosterin und 24 - Methylencholesterin (s.Abb. 3).Hauptsubstanz bei

den Triterpenoiden war Cycloartenol (57 %).Bei den Sterinen bildeten Cholesterin,β-Sitosterin und Stigmasterin mit zusammen fast 80 % die Hauptkomponenten.In der Pflanze liegen diese Verbindungen sowohl frei als auch mit Fettsäuren verestert vor.In quantitativ anderer Zusammensetzung kommen die genannten Sterine auch als Glykoside und Acylglykoside vor.Die Glykoside konnten als Galaktoside,die Acylglykoside als Palmitinsäureester dieser Galaktoside identifiziert werden (KÖSTENS u. WILLUHN 1973).

In den Blättern der Soladulcidin - und der Solasodin - Sippe wurden dieselben Sterine gefunden wie in der Tomatidenol - Sippe (WILLUHN u. KÖSTENS 1976).Die innerhalb der Art auftretende chemische Differenzierung in der Steroidalkaloidführung tritt somit erst bei dieser Stoffgruppe auf und nicht bereits bei den Biosynthese - Vorstufen,den Sterinen.

Die in den Blättern identifizierten Sterine sind auch in den Wurzeln,im Spross und in den unreifen und reifen Früchten von S. dulcamara enthalten und liegen hier ebenfalls sowohl frei als auch gebunden als Ester,Glykoside und Acylglykoside vor.Dabei ist der Anteil der freien Sterine und der genannten Sterinderivate in den einzelnen Organen unterschiedlich (WILLUHN u. KÖSTENS 1975).

Neben diesen durch konventionelle Extraktion mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren Sterinen und Sterinderivaten sind in den letzten Jahren in verschiedenen Pflanzen Steri-

ne gefunden worden,die nach erschöpfender Extraktion mit organischen Lösungsmitteln mit Wasser extrahierbar sind. Aus dem wässrigen Extrakt können sie erst nach Behandlung mit Alkali oder alkalischem Pyrogallol herausgelöst werden. Die quantitative Zusammensetzung dieser Sterinfraktion weicht von den mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren Sterinen ab.Bei S. dulcamara enthält sie mehr Cholesterin und weniger Campesterin (WILLUHN u. LIEBAU 1976).

II. Bisherige Untersuchungen zur Steroidführung pflanzlicher Zellkulturen

Es sind bereits von zahlreichen Pflanzenarten Zellkulturen angelegt und auf ihre biosynthetischen Potenzen hin untersucht worden.Die in Callus- und Suspensionkulturen nachgewiesenen Naturstoffe umfassen Zimtsäuren,Coumarine,Lignine, Flavonoide,Anthocyane,Tannine und ihre Vorstufen,Anthrachinone,Naphtochinone,Mono-,Sesqui-,Di- und Triterpene,Steroide,Carotinoide,Alkaloide und verschiedene andere Sekundärstoffe (PUHAN u. MARTIN 1971;BUTCHER 1977).Über die Bildung und den Stoffwechsel von Steroiden in pflanzlichen Zellkulturen haben STOHS u. ROSENBERG (1975) sowie STOHS (1977) zusammenfassend berichtet.Hier liegen einige Untersuchungen mit der Zielsetzung der Isolierung und Identifizierung der durch Callus- und Suspensionskulturen gebildeten Steroide vor.In anderen Arbeiten werden Zellkulturen zur Untersuchung der Biosynthesewege der Steroide sowie für Transformationsstudien zugefügter steroider Substrate herangezogen.Dabei sind bisher über 50 verschiedene Steroide aus verschiedenen pflanzlichen Zellkulturen isoliert worden.
Von den in Abbildung 3 (s.S. 16) aufgeführten,aus S. dulcamara isolierten tetrazyklischen Triterpenen und Monomethylsterinen,die die biosynthetischen Vorstufen der pflanzlichen Steroide darstellen (s. WILLUHN 1976),sind Cycloartenol,

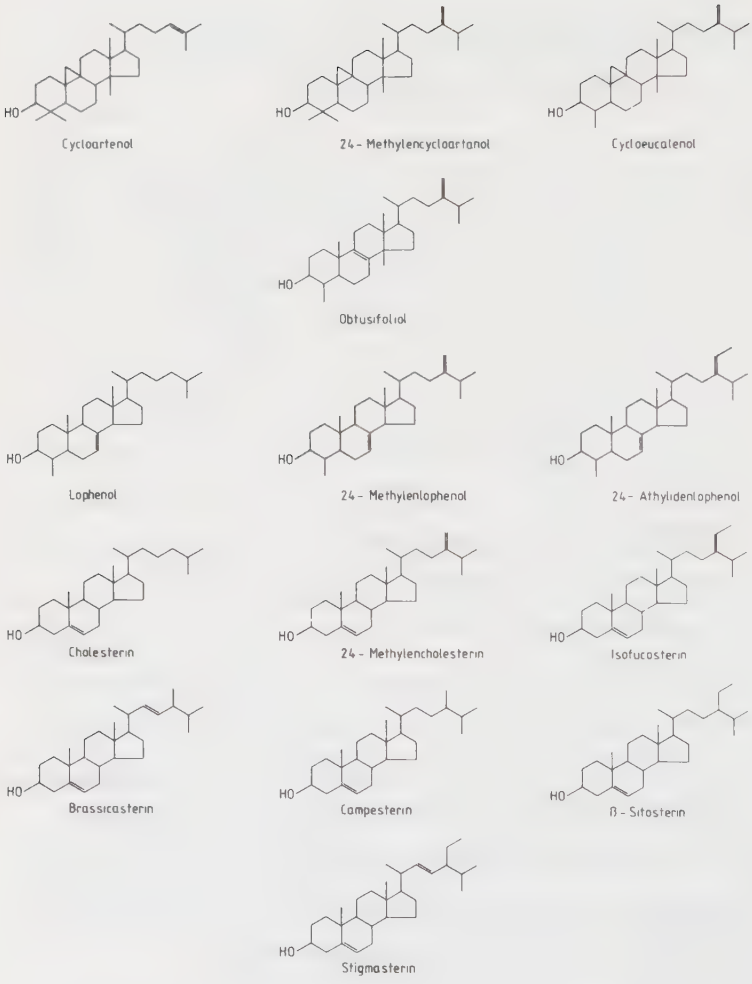


Abbildung 3 : Die Triterpenoide und Sterine von S. dulcamara

24 - Methylencycloartanol,Cycloeucalenol,Obtusifoliol und 24 - Methylenlophenol bisher nur in Calluskulturen von Nicotiana tabacum identifiziert worden (BENVENISTE et al. 1966 a, 1969;BENVENISTE 1968).Die Verfütterung von ^{14}C - Cycloartenol an das Tabakgewebe führte zur Markierung dieser Verbindungen sowie von 24 - Äthylidenlophenol,Campesterin,Sitosterin und Stigmasterin (HEWLINS et al. 1969).Diese Ergebnisse stimmten mit Untersuchungen in anderen Systemen überein,nach denen die Bildung von Sterinen in Pflanzen in der Reihenfolge Cycloartenol ⟶ 24 - Methylencycloartanol ⟶ Cycloeucalenol ⟶ Obtusifoliol ⟶ Lophenole ⟶ Sterine abläuft (WILLUHN 1976).Vor kurzem wiesen REINHARD und Mitarb. (1978) Cycloartenol und 24 - Methylencycloartanol auch in Zellkulturen von Digitalis lanata nach.

Sterine kommen in allen Pflanzen vor und werden als wesentliche Bestandteile der Zellmembranen angesehen.Sie sollten daher auch in allen Zellkulturen gebildet werden.Die Art der Sterine und ihre Mengenverhältnisse zueinander variieren jedoch von einer Pflanzenart zur anderen.Als ubiquitär verbreitete Sterine sind Sitosterin,Stigmasterin und Campesterin zu nennen (s.Abb. 3,S. 16).Sie konnten bisher aus einer ganzen Anzahl Gewebekulturen von Pflanzen verschiedener Gattungen isoliert werden,darunter Nicotiana tabacum (BENVENISTE et al. 1966 a;FURUYA et al. 1967;BENVENISTE 1969), Corchorus oblitorius (TARNG u. STOHS 1975),verschiedene Dioscorea - Arten (KAUL u. STABA 1968;KAUL et al. 1969; TOMITA et al. 1970;MARSHALL u. STABA 1976),Yucca glauca

(STOHS et al. 1975 a) und Stephania cepharantha (ITOKAWA et al. 1973).Dabei tritt entweder Sitosterin oder Stigmasterin als Hauptsterin auf.Auch in anderen Gewebekulturen wurden diese beiden Sterine angetroffen,allerdings ohne Campesterin : Paul's Scarlet Rose (WILLIAMS u. GOODWIN 1965), Holarrhena antidysenterica (HEBLE et al. 1971 c,1976) und Trigonella foenum - graecum (KHANNA u. JAIN 1973). Ausschliesslich Sitosterin wurde in Kulturen von Solanum xanthocarpum (HEBLE et al. 1968 b),S. laciniatum (SUPNIEWSKA u. DOHNAL 1972 a,b),Euphorbia esula und E. cyparissias (LEE u. STARRATT 1972),Apocynum cannabinum (LEE et al. 1972) sowie Morus alba (KUPARWI et al. 1970) nachgewiesen.

Cholesterin,das generell im Vergleich zu anderen Sterinen in Pflanzen in relativ geringen Mengen vorzukommen scheint, konnte u.a. in Kulturen von Dioscorea deltoidea (KAUL u. STABA 1968;KAUL et al. 1969;MARSHALL u. STABA 1976),D. tokoro (TOMITA et al. 1970),Holarrhena antidysenterica (HEBLE et al. 1971 c,1976) und Yucca glauca (STOHS et al. 1975 a) nachgewiesen werden.
24 - Methylencholesterin und Isofucosterin (24 - Äthylidencholesterin) wurden in Zellkulturen von Withania somniferum (YU et al. 1974) und Holarrhena antidysenterica (HEBLE et al. 1971 c,1976) gefunden.
Brassicasterin konnte bisher mit einer Ausnahme (RADWAN et al. 1975) nicht in Zellkulturen nachgewiesen werden.
Bis auf Lophenol ist somit die Bildungsmöglichkeit aller

bisher in S. dulcamara nachgewiesenen Methylsterine und Sterine durch Zellkulturen an anderen Pflanzenarten sichergestellt worden.

In der intakten Pflanze können die Sterine sowohl frei als auch als Ester,Glykoside und Acylglykoside vorliegen.In welcher Form die genannten Sterine in den analysierten Zellkulturen aufgetreten sind,wurde von den Autoren nicht untersucht.Erst während unserer Analysen haben RADWAN u. MANGOLD (976) und MANGOLD (1977) gezeigt,dass die Sterine auch in Zellkulturen sowohl frei und verestert als auch als Glykoside und Acylglykoside vorkommen können.

Die Verwendung des auch von S dulcamara gebildeten Spirostanols Diosgenin als Ausgangsmaterial zur Produktion von pharmazeutisch wichtigen Steroidhormonen hat die Untersuchung seiner Biosynthese durch pflanzliche Zellkulturen im Hinblick auf eine eventuelle wirtschaftliche Nutzung stark beeinflusst.Zum ersten Male wurde Diosgenin 1968 von KAUL u. STABA aus einer Calluskultur von Dioscorea deltoidea isoliert.STOHS und Mitarb. erweiterten 1975 (b) die Aussagen über die Syntheseleistungen von D. deltoidea - Kulturen dahingehend,dass Diosgenin das einzige Steroidsapogenin ist,das hier in vitro gebildet wird.

In der Folge konnte Diosgenin auch in Zellkulturen von D. composita,D. spiculiflora MEHTA u. STABA 1970),D. tokoro (TOMITA et al. 1970),D. floribunda (TOMITA u. UOMORI 1974),Trigonella foenum - graecum (KHANNA u. JAIN 1973; STEVENS u. HARDMAN 1974) und Momordica charantia (KHANNA u.

MOHAN 1973) identifiziert werden.Die Diosgeninbildung in Zellkulturen von Dioscorea deltoidea konnte durch 2,4 - Dichlorphenoxyessigsäure gefördert (KAUL et al. 1969) und der Einbau von markiertem Cholesterin und Sitosterin in Diosgenin in Zellkulturen nachgewiesen werden (STOHS et al. 1969,1974).Zusätzlich zum Diosgenin wurden in Zellkulturen von D. tokoro die Sapogenine Yonogenin und Tokorogenin gefunden (TOMITA et al. 1970).Auch ein Furostanolglykosid, Prototokorogenin,konnte isoliert werden (TOMITA u. NOMORI 1974).

Calli von Trigonella foenum - graecum produzieren neben dem Hauptsapogenin Diosgenin auch Tigogenin und Gitogenin (KHANNA u. JAIN 1973).Yucca glauca - Gewebekulturen bilden Gitogenin und in geringen Mengen Manogenin,das sich vom Gitogenin lediglich durch eine Carbonylgruppe am C-12 unterscheidet (STOHS et al. 1974).Die Wurzeln,Rhizome und Blätter der intakten Pflanzen bilden dagegen 8 Steroidsapogenine (BLUNDEN u. HARDMAN 1969).

Auch Solanum - Arten bilden Steroidsapogenine und daneben die stickstoffanalogen Steroidalkaloide vom Typ des Solasodins (s. Abb. 1,S. 10).Solasodin ist auf Grund seiner leichten Abbaubarkeit zu 3β - Acetoxy - pregna - 5,16 - dien - 20 - on ein ernsthafter Konkurrent des bisher meistverwendeten Steroid - Rohstoffes Diosgenin (SYHORA et al. 1962).

Calluskulturen von Solanum - Arten sind bisher jedoch nur

selten angelegt und auf ihre Fähigkeit zur Biosynthese der Steroidsapogenine und Steroidalkaloide überprüft worden.Es liegen hierzu Untersuchungen an S. xanthocarpum,S. laciniatum und S. lycopersicon (=Lycopersicum esculentum) vor.In Calluskulturen von S. xanthocarpum wurden Solasonin und Diosgenin nachgewiesen (HEBLE et al. 1968 a,b).Die Bildung von Solasonin erwies sich dabei als abhängig von der Wuchsstoffzusammensetzung des Nährmediums (HEBLE et al. 1971 a). Solasonin wurde nur bei Zugabe von 2,4 - D oder Kinetin und Gibberellinsäure an Stelle von 2,4 - D gebildet.Bei Verwendung von IES bzw. IBS (= β - Indolylbuttersäure) war kein Solasonin mehr nachweisbar.Stattdessen sank der Sitosteringehalt,während der Diosgeningehalt leicht anstieg.
In Calluskulturen von S. laciniatum konnten weder VAGUJFALVI und Mitarb. (1971) noch SUPNIEWSKA u. DOHNAL (1972 a,b) das Hauptsteroidalkaloid Solasodin der Pflanze nachweisen.Das Ausbleiben der Steroidalkaloid - Biosynthese könnte hier durch die in den Nährmedien verwendeten Wuchsstoffe bedingt sein.So benützten beide modifizierte Medien nach MURASHIGE u. SKOOG (1962).Während VAGUJFALVI und Mitarb. neben IES und Kinetin dem Medium noch Gibberellinsäure (GA_3) zufügten, reicherten SUPNIEWSKA u. DOHNAL die Nährlösung entweder mit IES,Kinetin und Maismilch oder Tomatensaft,Kinetin und Casein an.
Diosgenin bzw. Steroidsapogenine wurden von beiden Arbeitskreisen in den Zellkulturen dieser Art nachgewiesen.
Bei S. lycopersicon konnten RODDICK u. BUTCHER (1972) ledig-

lich in einer von vielen installierten Calluskulturen das Steroidalkaloidglykosid Tomatin in Spuren nachweisen.

Wegen der beträchtlichen medizinischen Bedeutung der Herzglykoside sind Callus- und Zellkulturen von herzglykosidführenden Pflanzen wiederholt untersucht worden.Bisher konntenjedoch keine oder nur kleinste Spuren von Cardenoliden in diesen Kulturen nachgewiesen werden (BÜCHNER u. STABA 1964;STOHS u. STABA 1964;CAREW u. STABA 1965;NETIEN u. LACHARME 1965;STABA et al. 1965;KAUL et al. 1967;MEDORA et al. 1967 a,b;GRAVES u. SMITH 1967;NETIEN et al. 1967;STABA 1969;PETIARD u. DEMARLY 1972;FURUYA et al. 1972;KHANNA u. MOHAN 1973).In keinem Falle ist bislang ein kristallines Cardenolid aus einer Zellkultur gewonnen worden.Wo ihr Auftreten beschrieben wurde,ist der Nachweis ausschliesslich auf chromatographischem Wege erfolgt.Meist wurden sie hierbei nur als KEDDE - positive Substanzen bezeichnet. Die gebildeten Cardenolide stimmten dabei in der Regel nicht mit denen der intakten Pflanze überein (STOHS u. ROSENBERG 1975;STABA 1977).Lediglich PETIARD u. DEMARLY (1972) weisen in Calluskulturen von Digitalis purpurea auf dünnschichtchromatographischem Wege dieselben Cardenolide wie in der Pflanze nach.Auch KARTNIG (1977),KARTNIG u. KOBOSIL (1977) sowie KARTNIG und Mitarb. (1976) konnten in Zellkulturen dieser Digitalis - Art dieselben Cardenolide wie in der intakten Pflanze nachweisen.Die Menge war jedoch klein und nahm mit steigender Kulturdauer ständig ab : die

16. bzw. 18. Passage war bereits wieder cardenolidfrei. PILGRIM (1972) konnte zeigen,dass Zellkulturen von D. purpurea nicht das für die Biosynthese der Cardenolide aus den Sterinen wichtige "cholesterol - side - chain cleaving enzyme" besitzen.Der Mangel an diesem Enzym könnte so für das Fehlen bzw. nur spurenhafte Auftreten von Cardenoliden in Zellkulturen verantwortlich sein.Zellkulturen von D. lanata erwiesen sich andererseits als in der Lage,von aussen zugeführte Cardenolide in der 12β - Position zu hydroxylieren und so etwa β - Methyldigitoxin in das medizinisch wertvolle β - Methyldigoxin zu überführen (REINHARD 1974; REINHARD et al. 1975;BOY 1975;WAHL 1977;ALFERMANN et al. 1976).

C. Spezieller Teil

I. Installierung der Calluskulturen von S. dulcamara

1. Material und Methoden

1.1. Herkunft der Pflanzen

Zu den Untersuchungen wurden Klonpflanzen der Tomatidenol -, Soladulcidin - und Solasodin - Sippe von S. dulcamara herangezogen.Die Pflanzen wurden im Botanischen Garten der J.W. Goethe - Universität Frankfurt a.M. und ab Sommer 1977 im Botanischen Garten der Universität Düsseldorf gehalten. Sie stammten von den entsprechenden Klonen aus dem Botanischen Garten der Philipps - Universität in Marburg/Lahn (DQ_1, DW_3,DFR),die dort seit 1961 in Kultur gehalten wurden. Mit diesen Klonen sind bereits mehrere Untersuchungen bezüglich ihrer chemischen Differenzierung (SANDER 1963b; WILLUHN 1966,1967,1968,1970;WILLUHN u. KUN - ANAKE 1970), der Sterinführung (KÖSTENS 1973;WILLUHN u. KÖSTENS 1974,1975, 1976;WILLUHN u. LIEBAU 1976) und der Steroidalkaloide im besonderen (SANDER 1963a) durchgeführt worden.Die Verwendung dieser Klonpflanzen ermöglicht so einen direkten Vergleich der biosynthetischen Potenzen der aus ihnen gewonnenen Calluskulturen mit denen der intakten Pflanzen.Die

Reinheit der drei chemischen Sippen hinsichtlich der Steroidalkaloidführung wurde 1973 von KÖSTENS und 1978 von KÖTHE (unveröffentlicht) in Düsseldorf erneut sichergestellt. Die Pflanzen der drei Klone wiesen bereits im Freiland Unterschiede in ihrem Wuchsverhalten auf,die sich auch im Verlaufe der Versuche zur Installierung von Calluskulturen bemerkbar machten.Der Soladulcidin - Klon zeigte im Freiland den kräftigsten Wuchs,während der Tomatidenol - Klon durch die lange Kultur am meisten an Vitalität eingebüsst hatte.

1.2. Ausgangsmaterial zur Installierung der Calluskulturen

Calluskulturen können im Prinzip von allen Teilen einer Pflanze gewonnen werden.Naturgemäss eignen sich Zellen aus Meristemen am besten.So ist es nicht verwunderlich,dass die ersten Gewebekulturen aus Kambialgeweben gezüchtet wurden (GAUTHERET 1934).
In der Folge konnten Calluskulturen auch aus Wurzeln (NOBECOURT 1937/38;GAUTHERET 1939;WHITE 1939),Sprossen (MOREL 1946;HILDEBRANDT et al. 1946;MURASHIGE u. SKOOG 1962;BABCOCK u. CAREW 1962;CAREW 1966;BENVENISTE et al. 1966a; KOBLITZ et al. 1967),Blättern (KOHLENBACH 1959,1967 a,b), Perikarpgewebe (s. bei KOBLITZ 1972),Antheren und Pollenkörnern (NITSCH u. NITSCH 1969;ZENKTELER 1973;GEIER u. KOHLENBACH 1973;WERNICKE u. KOHLENBACH 1977) angelegt werden.

Bei den Versuchen zur Installierung der Calluskulturen wurden sowohl Wurzeln,Sprosse und Blätter von Freilandpflanzen der drei chemischen S. dulcamara - Sippen als auch Keimwurzeln,Hypokotyle und Kotyledonen von steril angezogenen Keimlingen der Soladulcidin - und der Tomatidenol - Sippe herangezogen.

a) Wurzel-,Spross- und Blattexplantate von Freilandpflanzen

Aus dem Wurzelsystem der Pflanzen wurden ca. 7 mm lange Stücke mit einem Durchmesser von etwa 2 mm aus dem unteren Bereich herausgeschnitten.Bei den Sprossen wurden ca. 7 mm lange Stücke etwa 10 - 15 cm von der Spitze entfernt verwendet.In diesem Bereich war die Verholzung der Sprosse noch wenig ausgeprägt.Bei den Blättern wurden junge Blätter aus der Spitzenregion ausgewählt.

Die Sterilisation der Organe bzw. Organteile erfolgte mit einer 15 %igen Natriumhypochloritlösung.In dieser Lösung verblieben die Sprossstücke und ganzen Blätter unter leichtem Umrühren für drei,die Wurzelabschnitte für vier Minuten.Anschliessend wurde dreimal je drei Minuten lang mit sterilisiertem Wasser nachgewaschen,um alle Chlorrückstände zu entfernen.

Die Spross- und Wurzelstücke wurden beidseitig abgeschnitten, um bei dem Sterilisierungsvorgang abgestorbene Gewebepartien zu entfernen,dann der Länge nach halbiert und mit der Schnittfläche nach unten auf dem Agar - Nährboden ausgelegt. Die Länge der Inokulate lag bei 5 mm.

Die Blätter wurden in Stückchen von etwa 5 x 5 mm zerteilt und mit einer Schnittfläche einige Millimeter tief senk-

recht in den Agar hineingedrückt.

b) Radicula-,Hypokotyl- und Kotyledonen - Explantate

Samen der Soladulcidin - und der Tomatidenol - Sippe wurden 15 Minuten lang in einer 15 %igen Natriumhypochloritlösung sterilisiert und anschliessend zweimal mit sterilisiertem Wasser gewaschen.Zur Keimung der sterilisierten Samen wurden sterile Einmal - Petrischalen mit Filterpapier ausgekleidet,das zuvor 30 Minuten lang bei 112°C autoklaviert und mit sterilisiertem Wasser angefeuchtet worden war.Pro Petrischale wurden 30 Samen ausgelegt.Um die günstigsten Keimungsbedingungen zu ermitteln,wurden einige Petrischalen im Dauerdunkel stehen gelassen,während andere einem Hell - Dunkel - Rhythmus von 16 : 8 Stunden ausgesetzt waren.Hierbei zeigte sich,dass im Dauerdunkel nach 20 Tagen nur 0 - 3 % der Samen gekeimt waren,während die Keimungsrate bei der Hell - Dunkel - Haltung durchschnittlich bereits 60 % betrug.Die Samen mussten also im Licht zur Keimung gebracht werden.Dabei liessen sich nach vier Wochen Keimungsraten von 98 % bei der Soladulcidin - und von 75 % bei der Tomatidenol - Sippe erzielen.

Tests ergaben,dass auch die unter sterilen Bedingungen angezogenen Keimlinge noch einer Sterilisierung bedurften.Hier reichte jedoch eine zweiminütige Behandlung mit einer 10 %igen Natriumhypochloritlösung aus.Die Nachbehandlung erfolgte wie bei den Freilandpflanzen beschrieben.

Die vier Wochen alten Keimlinge wurden in Radicula,Hypokotyl und Kotyledonen zerteilt und auf dem Nährboden ausgelegt.

c) Explantate von Regeneraten

Schliesslich kamen auch noch im Laufe der Kultivierung von manchen Calli regenerierte,beblätterte Sprosse zur Verwendung.Sie wurden vom Callus abgetrennt und,gesondert nach Spross und Blatt,ebenfalls in Kultur genommen.

Die unter sterilen Bedingungen auszuführenden Arbeitsgänge wurden in einem "laminar - flow" bzw. einer sterilen Impfkammer durchgeführt.

1.3. Nährmedien

Die Grundlage,auf der ein geeignetes Nährmedium gesucht wurde,bildete das Medium nach MURASHIGE u. SKOOG (1962),das bei einer ganzen Reihe von Geweben zu guten Ergebnissen geführt hat und auch bei Solanaceen - Geweben (KAUL u. STABA 1968) bzw. Kulturen von Solanum - Arten schon mit Erfolg Verwendung fand (VAGUJFALVI et al. 1971;SUPNIEWSKA u. DOHNAL 1972a).Seine Zusammensetzung ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Eine umfassende Untersuchung über die Wirkung der organischen Zusätze findet sich bei LINSMAIER u. SKOOG (1965).Dieses Murashige/Skoog - Medium wird im folgenden als "Basalmedium" (BM) bezeichnet.
Zur Callusinduktion wurden dem BM verschiedene Auxin/Cytokinin - Gaben zugesetzt.Als Auxine fanden β - Indolylessigsäure (IES),α - Naphtylessigsäure (NES) oder 2,4 - Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 - D) Verwendung,als Cytokinin

Tabelle 1 : Zusammensetzung des Nährmediums nach MURASHIGE und SKOOG (1962)

A. Mineralsalze

Makroelemente			Mikroelemente		
NH_4NO_3	1650	mg/l	H_3BO_3	6,2	mg/l
KNO_3	1900	"	$MnSO_4 \times 4H_2O$	22,3	"
$CaCl_2 \times 2H_2O$	440	"	$ZnSO_4 \times 4H_2O$	8,6	"
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370	"	KJ	0,83	"
KH_2PO_4	170	"	$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,25	"
Na_2 - EDTA	37,3	"	$CuS\theta_4 \times 5H_2O$	0,025	"
$FeSO_4 \times 7H_2O$	27,8	"	$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,025	"

B. Organische Zusätze [+]

Saccharose	30,0 g/l
Caseinhydrolysat	1000,0 mg/l
Glycin	2,0 "
meso - Inosit	100,0 "
Nicotinsäure	0,5 "
Pyridoxin - HCl	0,5 "
Thiamin - HCl	0,1 "
Agar - Agar	1,0 %

[+] Für Nicotiana - Callus wurden IES und Kinetin in Konzentrationen von 1 - 30 mg/l bzw. 0,04 - 10 mg/l zugesetzt

6 - Furfurylaminopurin (= 6 - Furfuryladenin,Kinetin).Die getesteten Kombinationen sind in Tabelle 4 und 5 (S. 37 bzw. 39) aufgeführt.
Bei den Versuchen zur Optimierung des Calluswachstums erwies sich ein Vitaminzusatz als förderlich.Seine Bestandteile sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2 : Vitaminlösung zum Basalmedium

Cyanocobalamin	0,15 mg/l
Folsäure	50,00 "
Riboflavin	50,00 "
Biotin	100,00 "
Cholinchlorid	100,00 "
Calcium - Pantothenat	100,00 "
Pyridoxin - PO_4	100,00 "
Thiamin - HCl	100,00 "
Nicotinamid	200,00 "

Dieser Vitaminzusatz machte die Zugabe der im BM enthaltenen organischen Substanzen Nicotinsäure,Pyridoxin - HCl und Thiamin - HCl unnötig,die daraufhin dem BM nicht mehr zugesetzt wurden.Zugleich wurde auf den Zusatz von Glycin und Caseinhydrolysat verzichtet.Des weiteren zeigte sich eine Ergänzung des BM mit Gibberellinsäure GA_3 in einer Konzen-

tration von 1 ppm als wachstumsfördernd.Einen starken Wachstumsimpuls lieferte ferner ein Zusatz von Kokosmilch.
Als Standardmedium zur Produktion von Callusgewebe (SM) für die chemischen Analysen erwies sich nach diesen Untersuchungen für S. dulcamara folgendes Nährmedium als am besten geeignet :

A. Mineralsalze des BM (s. Tab. 1,S. 29)

B. Organische Zusätze :

Saccharose	30,0	g/l
meso - Inosit	100,0	mg/l
Vitaminlösung n. Tab. 2	10,0	ml/l
2,4 - D	1,0	ppm
Kinetin	0,05	"
GA_3	1,0	"
Kokosmilch	12	%
Agar	0,8	%

Die p.A. Chemikalien der Makro- und Mikroelemente stammten von der Firma Merck,Darmstadt;IES,NES und 2,4 - D von Fluka, die Gibberellinsäure GA_3 von Serva,Heidelberg.Der Agar - Agar "hochrein für die Mikrobiologie" wurde gleichfalls von Merck bezogen.
Die Kokosmilch wurde jeweils in der Zeit von Oktober bis Dezember von aus dem Handel bezogenen Kokosnüssen aus Sri Lanka gewonnen.Nach kurzem Aufkochen und Abkühlen liess sich das denaturierte Eiweiss durch Filtration über einen Büchner - Trichter abtrennen.In Plastiktüten eingeschweisst, konnte die Milch monatelang bei -18°C in der Tiefkühltruhe

aufbewahrt werden.Die pro Nuss gewonnenen Mengen differierten von Jahr zu Jahr sehr stark.Die Ausbeuten lagen zwischen 60 und 150 ml/Nuss.

Von den Makro- und Mikroelementen sowie den Vitaminen mit Ausnahme von Cholinchlorid,das stets frisch bereitet werden musste,wurden konzentrierte Stammlösungen angesetzt (Tab. 3) und bei Bedarf zur Herstellung des Nährmediums entsprechend verdünnt (Lösung I : 50,0 ml/l;Lösung II : 10,0 ml/l;Lösung III : 1,0 ml/l;Lösung IV : 0,1 ml/l;Lösung V : 5,0 ml/l). Die Vitamin - Stammlösung musste nach dem Ansetzen 30 Minuten lang bei 112°C autoklaviert und von da an als steril behandelt werden.Sie wurde dem Medium in einer Menge von 10,0 ml/l zugesetzt.

Zur Herstellung des Agar - Nährmediums wurden die Mineralsalzlösungen sowie die Vitaminlösung und die Kokosmilch in destilliertes Wasser gegeben und der Zucker,meso - Inosit-Cholinchlorid und die Wuchsstoffe hinzugefügt.Der pH - Wert der Lösung wurde mit 0,1 N NaOH auf 5,9 - 6,0 eingestellt. Nach Zugabe des Agars wurde das Medium 30 Minuten lang bei 112°C autoklaviert und noch heiss unter sterilen Bedingungen in die sterilen Kulturgefässe eingefüllt.

Tabelle 3 : Zusammenfassung der Nährsalze zu konzentrierten Stammlösungen

Lösung I	: NH_4NO_3	33000,0 mg/l
	KNO_3	38000,0 "
	$CaCl_2 \times 2H_2O$	8800,0 "
	$MgSO_4 \times 7H_2O$	7400,0 "
	KH_2PO_4	3400,0 "
Lösung II	: H_3BO_3	620,0 "
	$MnSO_4 \times 4H_2O$	2230,0 "
	$ZnSO_4 \times 4H_2O$	860,0 "
Lösung III	: KJ	830,0 "
	$CoCl_2 \times 2H_2O$	25,0 "
Lösung IV	: $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	2500,0 "
	$CuSO_4 \times 5H_2O$	250,0 "
Lösung V	: Na_2 - EDTA	7460,0 "
	$FeSO_4 \times 7H_2O$	5560,0 "

1.4. Kulturbedingungen

Als Kulturgefässe dienten 100 ml Weithals - Erlenmeyerkolben,die mit Steri - Stopfen (Fa. Herenz,Hamburg) verschlossen wurden.Darüberhinaus wurde über Kolben und Stopfen Aluminiumfolie gespannt um zu verhindern,dass während der Passagierungszeit Keime auf Stopfen oder Kulturgefässrand gelangen konnten.Nach Heissluftsterilisierung der Kolben samt Stopfen und Aluminiumfolie für vier Stunden bei 180°C wurden sie mit je 50 ml Nährmedium beschickt,das darin erstarrte.

Die Kulturen wurden in einem klimatisierten Raum bei 25 ± 1°C und einer Luftfeuchtigkeit von 65 - 70 % im Dauerdunkel,im Dauerlicht oder in einem Hell - Dunkel - Rhythmus von 16 : 8 Stunden gehalten.Als Beleuchtung dienten Tageslicht - Leuchtröhren der Firma Philips (TL 65 W/47).Die Beleuchtungsstärke lag zwischen 800 und 1000 Lux.
Die Subkultivierung * erfolgte in einem 28 Tage - Rhythmus,da Versuche zeigten,dass die Zuwachsrate nach jeweils vier Wochen Kulturdauer stark absank.Zeigten sich - hervorgerufen durch besonders starkes Wachstum - schon früher Risse im Agar,so musste entsprechend früher auf frisches Medium umgesetzt werden.

---

* Frau G. Herrmann danke ich für ihre Hilfe bei der Betreuung der Calluskulturen

Die Kölbchen wurden mit jeweils 4 etwa 0,9 - 1,0 g schweren Callusstückchen beschickt,da sich gezeigt hatte,dass eine zu dünne Beimpfung der Kulturgefässe die Wachstumsrate stärker beeinträchtigte als eine zu dichte.Die erste Passage erfolgte mitsamt dem Explantat nach dem ersten makroskopisch sichtbaren Auftreten von Callusgewebe.Die Abtrennung des Callus' vom Explantat fand statt,sobald seine Grösse dies ermöglichte.In der Regel war dies bei der Anlage der 2. Passage der Fall,d.h. etwa 10 Wochen nach dem Ansetzen der Kultur.
Mit dem Abernten des Callusmaterials wurde ab der 8. Passage begonnen - gezählt nach dem letzten Auftreten von Regeneraten in der jeweiligen Kultur.Nach sorgfältiger Befreiung der Callusstücke von anhaftenden Agar - Resten wurden sie kleingehackt und gefriergetrocknet.Der Gewichtsverlust lag dabei bei 93 %.

1.5. Bestimmung der Zuwachsrate

Für die Bestimmung der Zuwachsrate der Kulturen wurde der Wachstumsquotient nach TULECKE u. NICKELL (1959) bzw. MATHES (1967) herangezogen.Er ergibt sich aus dem Verhältnis von Endfrischgewicht zu Anfangsfrischgewicht der Calli.Zur Ermittlung eines Wertes wurden jeweils 10 Kölbchen verwendet.

2. Versuche und Ergebnisse zur Calluskultur

2.1. Initialkulturen

Erste Versuche,Blatt- und Wurzelstücke der drei Solanum dulcamara - Sippen auf dem unveränderten Medium nach MURASHIGE u. SKOOG (s.Tab. 1,S. 29) zu einer Callusproduktion anzuregen,brachten negative Ergebnisse.
Aus der Literatur geht hervor (GAUTHERET 1959;STREET 1973), dass für eine gute Zellproliferation zur Gewinnung von Primärcalli in sehr vielen Fällen ein bestimmtes Auxin/Cytokinin - Verhältnis gegeben sein muss,das bei verschiedenen Pflanzenarten und auch bei den einzelnen Organen variieren kann.Daher wurden dem BM verschiedene Auxin/Cytokinin - Gemische zugesetzt (Tab. 4 u. 5).
Als Auxine kamen IES,NES und 2,4 - D zur Prüfung,als Vertreter der Cytokinine Kinetin.
Pro Organ und BM - Variation wurden 5 Kulturgefässe mit je 4 Explantaten angesetzt.Alle Medien wurden sowohl im Dauerdunkel als auch bei einem Hell - Dunkel - Rhythmus von 16 : 8 Stunden getestet.Dabei erwies sich,dass die Kulturen im Dauerdunkel schneller und häufiger zur Callusbildung kamen (s. auch Abb. 6).
Die Wirksamkeit des jeweiligen Mediums wurde danach beurteilt,wieviele der jeweils angesetzten Explantate einen Primärcallus bildeten und wie schnell dieser wuchs.

2.1.1. IES / Kinetin - Kombinationen

In einer umfangreichen Versuchsreihe wurde zunächst IES als Auxin verwendet und in 56 Kombinationen mit Kinetin geprüft (Tab. 4).Es kam jedoch weder bei den Blatt- noch bei den Wurzelexplantaten zu einer äusserlich sichtbaren Callusbil-

Tabelle 4 : Test - Kombinationen von IES bzw. 2,4 - D mit Kinetin

Kinetin (ppm) \ IES oder 2,4-D (ppm)	0	0,01	0,1	0,2	0,5	1,0	10,0
0	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7
0,005	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6	B_7
0,01	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7
0,025	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7
0,05	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7
0,1	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	F_6	F_7
0,5	G_1	G_2	G_3	G_4	G_5	G_6	G_7
1,0	H_1	H_2	H_3	H_4	H_5	H_6	H_7

dung.Während sich die Blattexplantate rasch braun färbten und abstarben,zeigten die Wurzelstücke in der Kulturzeit von 6 - 8 Wochen keine Veränderungen.Diese ausgetesteten Nährmedien erhielten deshalb keine Bezeichnungen.Die in Tabelle 4 angegebenen Buchstaben - Zahlen - Kombinationen beziehen sich daher auf die 2,4 - D/Kinetin - Gemische.

2.1.2. NES / Kinetin - Kombinationen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde NES als Auxin verwendet,das als künstliches Auxin stärker wirksam ist als IES. Die getesteten 20 NES/Kinetin - Kombinationen sind in Tabelle 5 aufgeführt.Auch hier waren keine Anzeichen einer Produktion von Callusgewebe an den Wurzel- und Blattexplantaten festzustellen.Die Blattexplantate blieben jedoch auf diesem Nährboden länger saftig grün.

Da von Sprossen im allgemeinen leichter Callus zu gewinnen ist,wurden nunmehr auch Sprossstücke in die Versuche einbezogen.Auch diese konnten auf den verschiedenen NES/Kinetin - Nährböden nicht zur Callusbildung angeregt werden.

Tabelle 5 : Test - Kombinationen von NES mit Kinetin

Kinetin (ppm) \ NES (ppm)	0,01	0,1	1,0	5,0	10,0
0,0025	I_1	I_2	I_3	I_4	I_5
0,005	K_1	K_2	K_3	K_4	K_5
0,05	L_1	L_2	L_3	L_4	L_5
0,1	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5

2.1.3. 2,4 - D /Kinetin - Kombinationen

Die Verwendung von 2,4 - D/Kinetin - Kombinationen als Wuchsstoffe (s. Tab. 4) führte zu den ersten positiven Ergebnissen einer Callusinduktion bei den Spross- und Blattexplantaten der Soladulcidin - und der Solasodin - Sippe. Ab Medium A_4 begann bei den Spross- und ab Medium C_6 bei den Blattexplantaten eine Callusbildung.Die ersten äusserlich sichtbaren Zeichen hierfür traten nach durchschnittlich 6 Wochen auf,jedoch nie früher als nach 4 Wochen.Die Blatt-

explantate benötigten zur Callusbildung stets länger als die Sprossstücke.Die Wurzelexplantate und auch die Spross- und Blattexplantate der Tomatidenol - Sippe konnten auch hier nicht zur Callusbildung angeregt werden.Das negative Ergebnis bei der Tomatidenol - Sippe könnte seine Ursache darin finden,dass,wie erwähnt,die Klonpflanzen schon im Freiland kein vitales Wachstum mehr zeigten.

In den Abbildungen 4 und 5 sind die erzielten Ergebnisse mit den Spross- bzw. Blattexplantaten zusammengefasst.In den Medien ohne 2,4 - D erfolgte keine Callusbildung (s. 1. Senkrechtspalte).Desgleichen unterblieb eine Callusbildung durchgehend bei allen Medien mit der höchsten Kinetingabe (1 ppm;Medien der H - Reihe).In allen Medien mit der höchsten 2,4 - D - Konzentration (10,0 ppm;letzte Senkrechtspalte) regenerierten die Calli ab der ersten Passage Wurzeln,die jedoch stets nur eine Länge von maximal 3 mm erreichten. Dieser Befund entspricht der Erfahrung,dass hohe Auxin - Konzentrationen im Vergleich zu wenig Kinetin zur Regeneration von Wurzeln führen (s. KOBLITZ 1972).Eine Ausnahme in dieser Spalte stellt lediglich das Medium G_7 dar,in dem diese Wirkung wahrscheinlich durch die relativ hohe Kinetingabe wieder kompensiert wird.
In den Medien F_2 , F_4 - F_6 sowie G_2 und G_3 neigten die entstandenen Primärcalli zur Regeneration von bis zu 3 cm langen,beblätterten Sprossen.In den Medien F_3 , G_5 und G_6 bildeten die entstandenen Calli sowohl Sprosse als auch

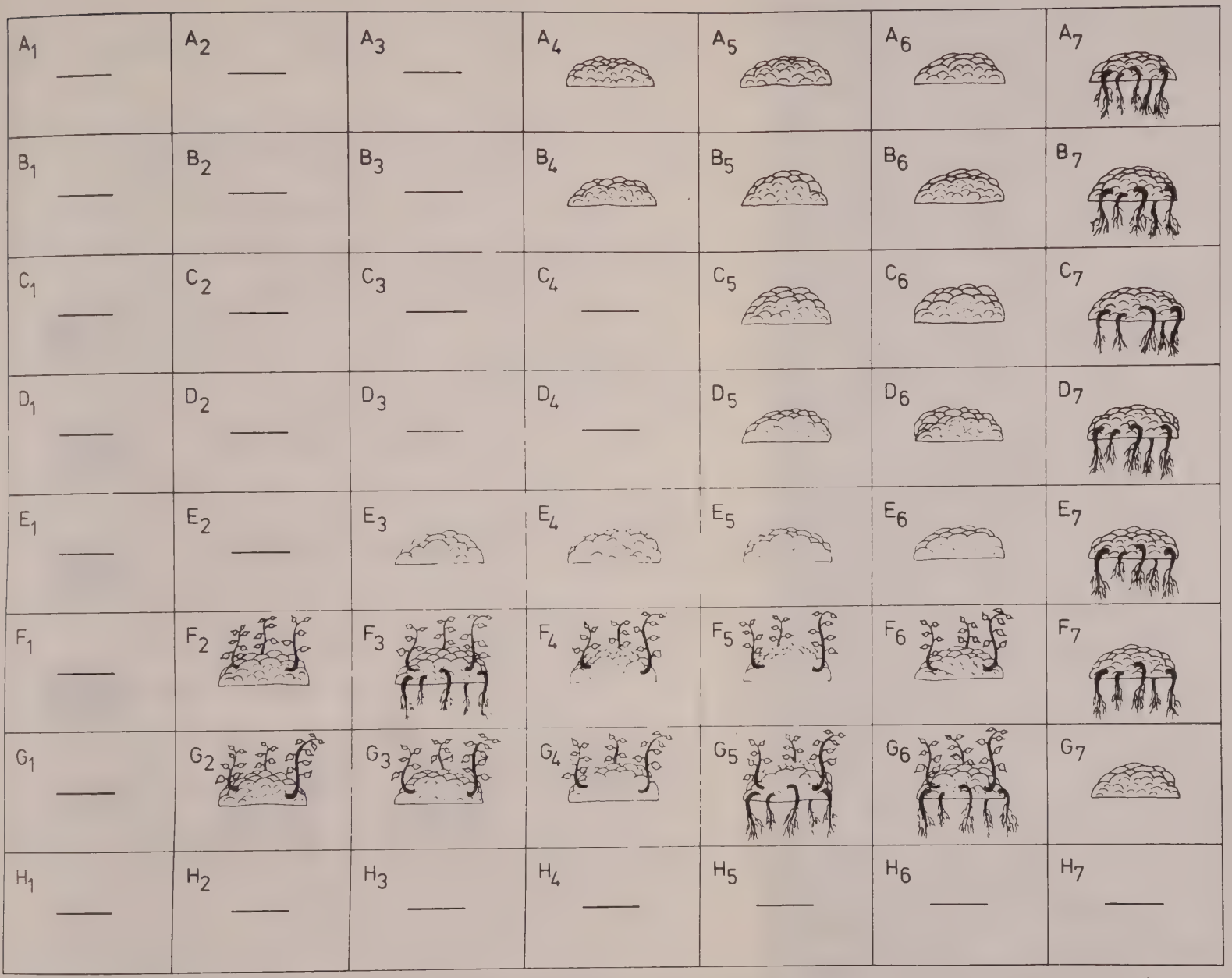


Abbildung 4 : Callusbildung von im Dauerdunkel gehaltenen Sprossexplantaten der Solanum dulcidin-Sippe in Medien mit verschiedenen 2,4-D - Kombinationen

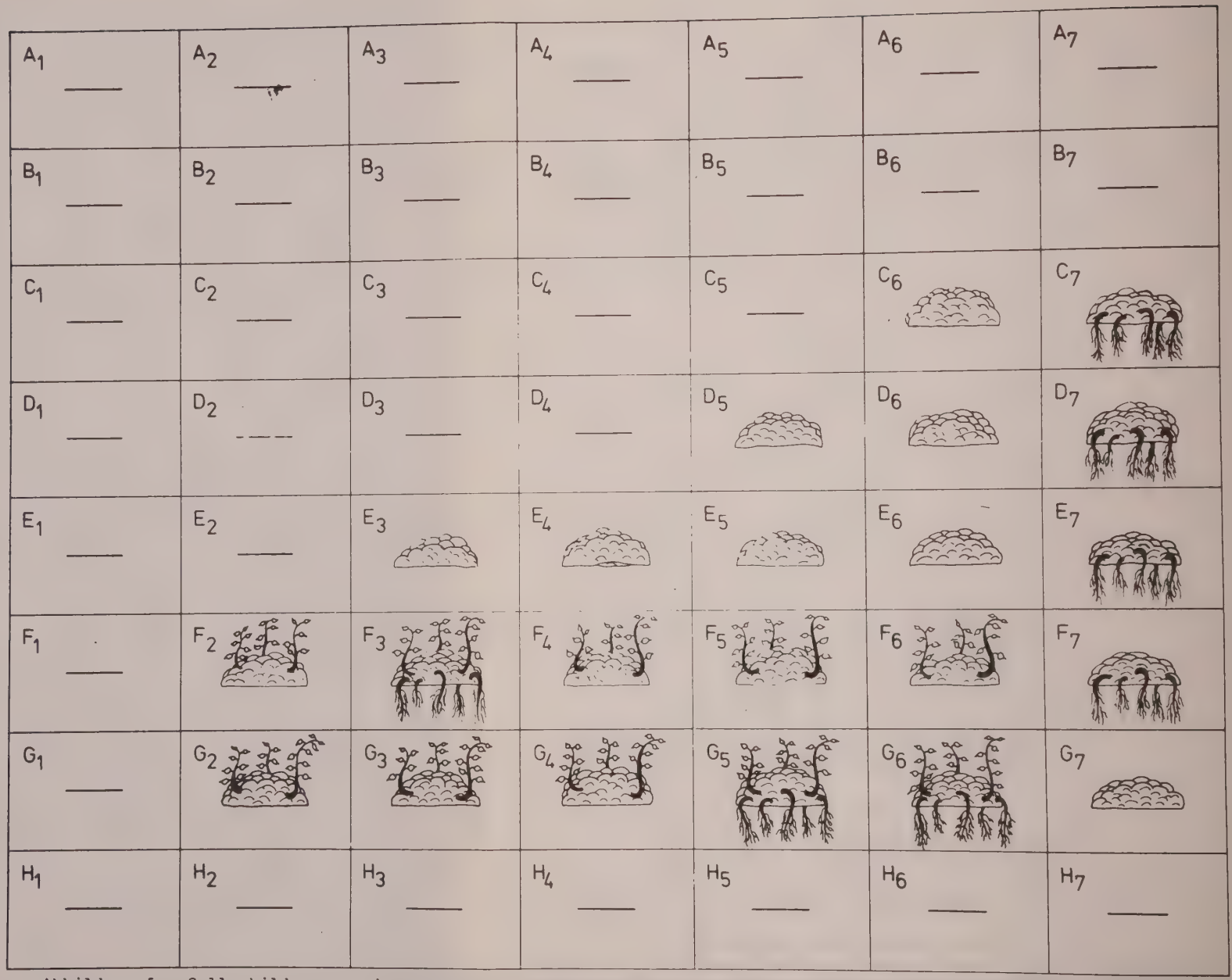


Abbildung 5 : Callusbildung von im Dauerdunkel gehaltenen Blattexplantaten der Soladulcidin-Sippe in Medien mit verschiedenen 2,4-D - Kombinationen

Wurzeln.

2.1.4. Zugabe von Kokosmilch zur Callusinduktion

Da bei den getesteten Nährmedien die Wurzeln aller drei chemischen Sippen und bei der Tomatidenol - Sippe darüberhinaus auch die Blatt- und Sprossexplantate nicht zur Callusbildung angeregt werden konnten,wurden alle Medien, auf denen bereits mit 2,4 - D und Kinetin Callusbildung aufgetreten war (Sprossexplantate : A_4 - A_7 ; B_4 - B_7 ; C_5 - C_7 ; D_5 - D_7 ; E_3 - E_7 ; F_2 - F_7 ; G_2 - G_7 ; Blattexplantate : C_6 , C_7 ; D_5 - D_7 ; E_3 - E_7 ; F_2 - F_7 ; G_2 - G_7),in einer weiteren Versuchsreihe mit 6 , 8 , 10 , 12 , 15 , 18 , 20 und 25 % Kokosmilch komplettiert.Ein Zusatz von 12 % erwies sich als am günstigsten,sowohl was die Wirkung anging als auch nach wirtschaftlichen Gesichtspunkten.
Pro Medium wurden jeweils 5 x 4 Wurzel-,Spross- bzw. Blattexplantate angesetzt und im Dauerdunkel sowie in einem Hell - Dunkel - Rhythmus (16 : 8 Std.) kultiviert.

Auch durch Zusatz von Kokosmilch konnte keine Callusbildung bei den Wurzelexplantaten der drei S. dulcamara - Sippen erreicht werden.Die Blatt- und Sprossexplantate der Tomatidenol - Sippe erbrachten auch hier wiederum negative Resultate.Während der Kokosmilch - Zusatz bei den Explantaten der Solasodin - Sippe keine Verbesserung der Primärcallus-

bildung erbrachte,war bei den Explantaten der Soladulcidin - Sippe eine fördernde Wirkung zu beobachten.
In Abbildung 6 sind die Ergebnisse der Callusinduktion in den getesteten Nährmedien am Beispiel der Sprossexplantate der Soladulcidin - Sippe graphisch wiedergegeben.Die Zahl der callusbildenden Explantate war bei den im Dauerdunkel gehaltenen Kulturen allgemein höher als bei den Hell - Dunkel - Kulturen.Bei letzteren trat darüberhinaus die Callusbildung erst in Medien mit höheren 2,4 - D - Gaben ein.Als bestes Medium für die Callusinduktion erwies sich das Medium E_6,in dem von 20 Explantaten unter diesen Bedingungen 14 Explantate im Dauerdunkel bzw. 10 Explantate im Hell - Dunkel - Rhythmus Primärcalli entwickelten.

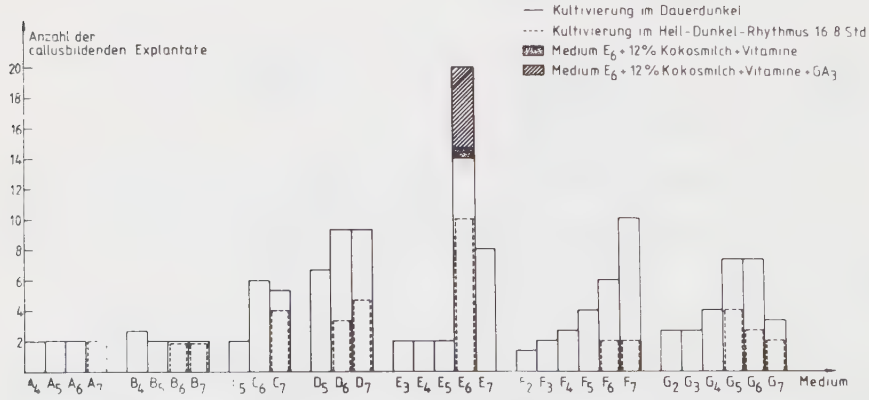


Abbildung 6 : Callusinduktion in den getesteten Nährmedien Medium : Mineralsalze des BM(s.Tab. 1,S. 29),Saccharose, meso - Inosit,2,4 - D,Kinetin,12 % Kokosmilch)

2.1.5. Callusbildung aus Keimlingsorganen

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Callusinduktion unter Verwendung der Organe von steril angezogenen Keimlingen (Radicula,Hypokotyl und Kotyledonen) der Soladulcidin - und der Tomatidenol - Sippe getestet.Als Nährmedien wurden hierbei nur diejenigen,jeweils mit 12 % Kokosmilch komplettierten,herangezogen,die bereits bei den Explantaten der Freilandpflanzen zu einem positiven Ergebnis geführt hatten. Auch hier bildeten die Hypokotyl- und Keimblattexplantate der Soladulcidin - Sippe durchgehend Primärcalli.Als am günstigsten erwies sich wiederum das Medium E_6.Keine Explantatbildung erfolgte jedoch bei den Keimwurzelexplantaten. Auch die Explantate der Tomatidenol - Keimlinge konnten nicht zur Callusbildung angeregt werden.

Als Vorteil gegenüber der Callusgewinnung aus Freilandmaterial könnte der Umstand angesehen werden,dass die Primärcalli hier bereits nach 14 - 21 Tagen auftraten.Die weitere Wachstumsgeschwindigkeit war jedoch gegenüber der der Calli von Freilandpflanzen nicht erhöht.Rechnet man die lange Anzuchtphase der Keimlinge hinzu,so ergeben sich keine Vorteile gegenüber der Arbeit mit Freilandmaterial.

2.1.6. Zusammenfassung

Das Ergebnis dieser umfangreichen Testreihen zur Gewinnung eines Primärcallus' ohne Regenerationsneigung von den drei chemischen S. dulcamara - Sippen ist in den Abbildungen 4 - 6 zusammengefasst worden.
Die Spross- und Blattexplantate der Soladulcidin - und der Solasodin - Sippe konnten unter Verwendung von 2,4 - D/Kinetin - Kombinationen auf einem Medium zur Bildung eines Primärcallus' angeregt werden,das die Mineralsalze des BM nach MURASHIGE u. SKOOG enthielt,sowie Saccharose,meso - Inosit und Agar.Als am besten geeignet erwies sich hierfür das Medium E_6 mit einem 2,4 - D/Kinetin - Verhältnis von 1 : 0,05 ppm (Abb. 4 u. 6).
Wurzelexplantate führten dagegen in den getesteten Nährmedien zu keiner Callusbildung.Das gleiche gilt für die Spross- und Blattexplantate der Tomatidenol - Sippe,von der die Freilandpflanzen seit 16 Jahren als Klon in Kultur waren und die im Vergleich zu den beiden anderen Sippen ein schlechtes Wuchsverhalten zeigte.Diese schwache Vitalität der Ausgangspflanzen wurde zunächst als Grund dafür angesehen,dass von dieser Sippe keine Calli erzielt werden konnten,da ganz allgemein die spezifischen Ansprüche an ein Kulturmedium steigen,je weniger vital die Pflanzen sind,von denen man ausgeht.Auch ein Zusatz von Kokosmilch zu dem für die Callusinduktion günstigen Medium E_6 führte bei dieser Sippe

zu keiner Callusbildung.

Bei der Verwendung von Keimpflanzenorganen konnten nur Hypokotyl- und Kotyledonexplantate zur Produktion eines Callus' angeregt werden.Abgesehen von einem früheren Auftreten der Primärcalli (2 - 3 Wochen gegenüber 4 - 6 Wochen bei den Calli von Freilandpflanzen),waren keine Unterschiede zu den Calli aus adulten Organen erkennbar.

Die Versuche mit sterilen Tomatidenol - Keimlingen führten zu keiner Callusbildung.Daraus kann man schliessen,dass für das generelle Ausbleiben einer Callusbildung bei den Explantaten der Tomatidenol - Sippe in den getesteten Nährmedien nicht allein die geringe Vitalität der Klonpflanzen dieser Sippe verantwortlich zu machen ist,sondern dass die Pflanzen dieser Sippe andere Bedingungen für die Callusinduktion benötigen als die Pflanzen der beiden anderen Sippen.Dasselbe gilt für die Wurzelexplantate.Weitere Versuche zur Ermittlung dieser anderen,spezifischen Ansprüche an das Medium wurden nicht unternommen.
Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigten die im Dauerdunkel gehaltenen Explantate generell eine bessere Callusbildung als die Kulturen,die einem Hell - Dunkel - Rhythmus von 16 : 8 Stunden exponiert waren.
Als Nebenergebnis der Versuche zur Induktion eines Callus' erwies sich,dass S. dulcamara zu denjenigen Pflanzen gehört,deren Calli sich leicht zur Organbildung und zur Re-

generation intakter Pflanzen bringen lassen.So wurden verschiedene 2,4 - D/Kinetin - Kombinationen gefunden,die zur Induktion von Wurzeln,beblätterten Sprossen sowie Wurzeln und beblätterten Sprossen zur gleichen Zeit führten (Abb.4 u. 5,S. 41 u. 42).

2.2. Versuche zur Optimierung des Calluswachstums

2.2.1. Soladulcidin - Sippe

2.2.1.1. Ergänzung des Nährmediums mit Vitaminen und Gibberellinsäure GA_3

Bei den Versuchen zur Callusinduktion wurden mit dem Nährmedium E_6 + 12 % Kokosmilch die besten Ergebnisse erzielt.Die auf diesem Nährmedium gewonnenen Primärcalli von Spross- und Blattexplantaten wurden nach der zweiten Passage von noch anhaftendem Explantat befreit und zunächst auf diesem Medium im Dauerdunkel weiterkultiviert.Die Calli erschienen weiss und hart,färbten sich jedoch bald braun.Gleichzeitig kam es zu einem Wachstumsstillstand und schliesslich zum Absterben der Calli in der Regel während der dritten Passage.Diese Hemmung des Calluswachstums kann auf der Bildung von Polyphenolen beruhen (KOBLITZ 1972).
Diese Wachstumsschwierigkeiten machten eine erneute Variation des Mediums nötig.So wurde zunächst das Nährmedium E_6 mit den Vitaminen Cyanocobalamin,Biotin,Folsäure,Cholin-

chlorid,Calcium - Pantothenat,Riboflavin,Pyridoxin - PO_4, Thiamin - HCl und Nicotinamid ergänzt,die nach Angaben der Literatur fördernd auf das Calluswachstum verschiedener Pflanzenarten wirken (MURASHIGE u. SKOOG 1962;LINSMAIER u. SKOOG 1965;BUTENKO 1968;KAO u. MICHAYLUK 1975).Hierdurch wurde eine - wenn auch kleine - Steigerung von Wachstum und Lebensdauer der Calli erzielt.Das Wachstum blieb jedoch unbefriedigend und erreichte nach sieben Wochen Kulturdauer nur einen Zuwachs von 175 % (Abb. 7).

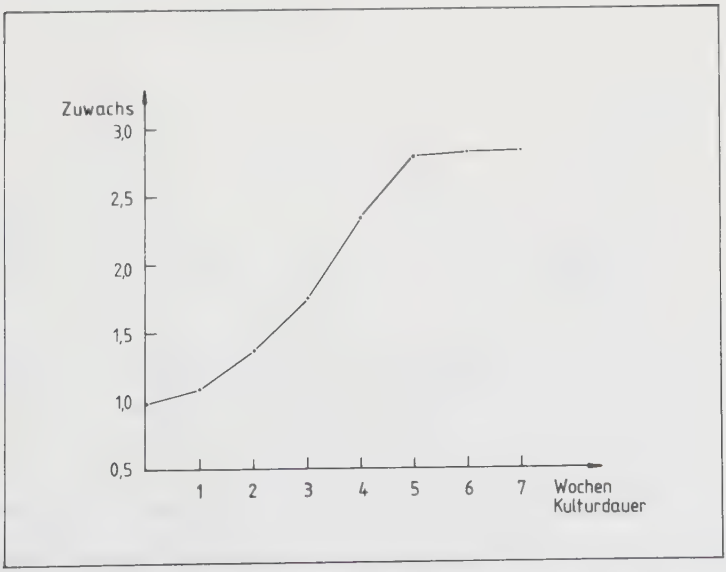


Abbildung 7 : Wachstumskurve des Sprosscallus' der Soladulcidin - Sippe;Medium E_6 + Vitamine + 12 % Kokosmilch;Dauerdunkel,3. Passage

Nach Angaben der Literatur können auch Gibberellinsäure - Gaben zu einem besseren Calluswachstum führen (NETIEN 1958; MURASHIGE 1964,1965;LINSMAIER u. SKOOG 1965;GRÜTZMANN 1966; KOBLITZ et al. 1967;SANGWAN u. HARADA 1976).Das bereits mit der Vitaminlösung versehene Nährmedium E_6 + 12 % Kokosmilch wurde deshalb durch einen Zusatz von 1 ppm Gibberellinsäure GA_3 komplettiert.Dies führte zu einer geringen Wachstumssteigerung der Blatt- und Sprosscalli : sie erreichten in sieben Wochen einen Zuwachs von 200 bzw. 260 % (Abb. 8 u. 9).

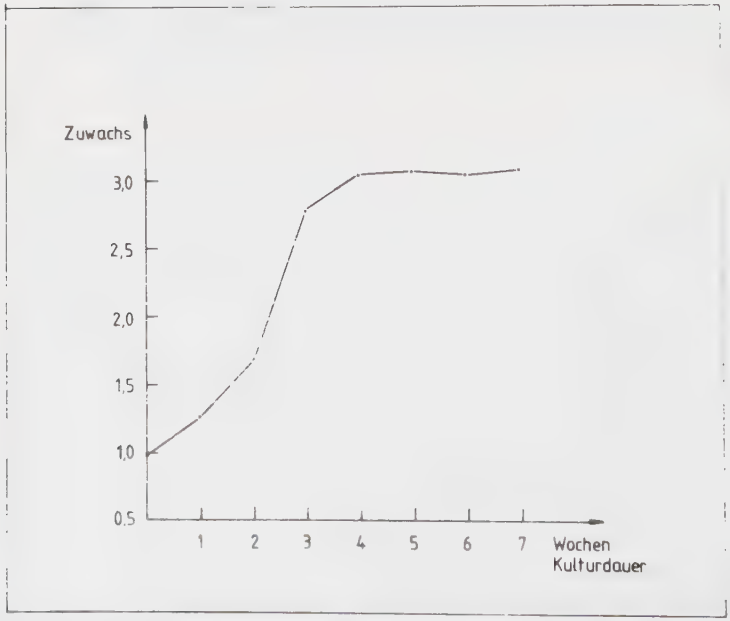


Abbildung 8 Wachstumskurve des Blattcallus' der Soladulcidin - Sippe;Medium E_6 + Vitamine + 12 % Kokosmilch + GA_3;Dauerdunkel,9. Passage

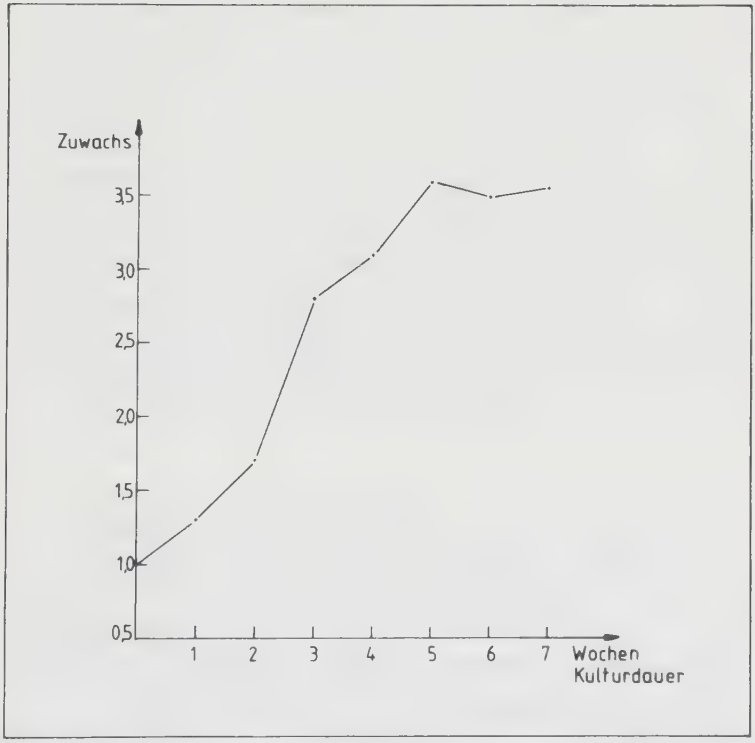


Abbildung 9 : Wachstumskurve des Sprosscallus' der Soladulcidin - Sippe;Medium E_6 + Vitamine + 12 % Kokosmilch + GA_3;Dauerdunkel,5. Passage

Darüberhinaus blieben die Calli bei den weiteren Passagierungen am Leben.Sie werden seit nunmehr drei Jahren in Kultur gehalten,ohne dass die Zusammensetzung des Mediums bisher geändert werden musste.Die Calli lassen jedoch offenbar jahreszeitlich bedingte Schwankungen der Wachstumsrate erkennen.So lässt das Wachstum im Herbst nach,bis es in den Wintermonaten fast vollständig zum Erliegen kommt.Etwa im

Februar setzt dann wieder ein kräftigeres Wachstum ein,das den Sommer über anhält.

2.2.1.2. Calluswachstum und -entwicklung unter veränderten Lichtbedingungen

Licht steuert die Bildung von Chloroplasten in Zell- und Gewebekulturen (STREET 1973).Es ergrünen jedoch keineswegs alle Gewebekulturen unter Lichteinfluss.Auch das Wachstum von Kulturen,die kein Chlorophyll bilden,kann durch Licht gefördert werden (GAUTHERET 1959;STREET 1966;KOBLITZ 1972).

Daher wurden Versuchsreihen angelegt,in denen die Spross- und Blattexplantate entweder im Dauerlicht bei 800 - 1000 Lux,im Dauerdunkel oder in einem Hell - Dunkel - Rhythmus von 16 : 8 Stunden wuchsen.Als Nährmedium wurde das Medium E_6 + Vitamine + 12 % Kokosmilch + GA_3 herangezogen,das sich als am günstigsten erwiesen hatte.Es ergab sich,dass Licht - sowohl als Dauerlicht wie auch als Hell - Dunkel - Kombination - keinen fördernden Einfluss auf das Wachstum der Blatt- und Sprossexplantate ausübte,wie auch schon bei der Callusinduktion festgestellt worden war.Zuweilen schien sogar eine Hemmwirkung des Lichtes erkennbar zu sein.
Bei den Calli,die später zur Bestimmung ihrer Inhaltsstoffe herangezogen wurden,erfolgte die Kultivierung daher ausschliesslich im Dauerdunkel.

2.2.1.3. Mutationen und Produktion von Callusgewebe

Zur Produktion von Callusgewebe für die chemischen Analysen wurden bei der weiteren Kultur folgende Bedingungen gewählt : Medium E_6 + Vitamine + 12 % Kokosmilch + GA_3;Dauerdunkel Raumtemperatur 25 $\pm$ 1°C (s.S. 34).Dieses Nährmedium hatte sich von allen getesteten Medien als das beste erwiesen.Nachfolgende Untersuchungen ergaben,dass es auch für die Callusinduktion bei Spross- und Blattexplantaten von S. dulcamara am besten geeignet ist.Im Dauerdunkel kamen auf diesem Medium praktisch alle ausgelegten Explantate zur Bildung eines Primärcallus',was in Abbildung 6 (S. 44) bereits mit dargestellt worden ist.

Bei der Callusproduktion traten unter diesen Bedingungen bis zur 6. (Blatt) bzw. 7. (Spross) Passage in den Callusgeweben keine sichtbaren Mutationen auf.Danach begann vor allem der von Sprossexplantaten stammende Callus,verschiedene Mutationen zu entwickeln.Diese Mutanten wuchsen schneller als der Callus,von dem sie stammten und zeigten durchweg einen lockeren Zellverband.Sie wurden isoliert und getrennt weiterkultiviert.

Für die Untersuchungen zur Steroidführung der Soladulcidin - Sippe wurden folgende Calli kultiviert :

Callus A : Subkultivierter Sprosscallus aus unmutiertem Primärcallus.Er erschien rein weiss und war sehr fest.Das Wachstum war mässig (Abb. 9,s.S. 51 u. 10,s.S. 55)

Callus B : Mutante aus dem Sprosscallus A.Er zeigte eine weissliche Färbung und erwies sich als weicher als der unmutierte Callus A (Abb. 11,s.S. 55).

Callus C : Es handelte sich gleichfalls um eine Mutation des Sprosscallus' A.Sie war durchscheinend farblos mit sehr lockerem Zellverband und der höchsten Wuchsgeschwindigkeit aller hier aufgeführten Calli : der Callus produzierte in 5 Wochen das 5,5fache seines Ausgangsgewichtes (Abb. 12 u. 13,s.S. 56 u. 57).

Callus D : Diese Mutante unterschied sich von dem Callus C nur darin,dass sich mitten in dem sonst durchscheinend - farblosen Gewebe Bezirke ausbildeten, deren Zellen bräunlich gefärbt erschienen.

Callus E : Blattcallus der Soladulcidin - Sippe.Er zeigte denselben Habitus wie der Sprosscallus A (Abb. 14, s.S. 57).

Mit dem Abernten der Calli für die chemischen Analysen wurde frühestens nach der 8. Passage begonnen (s.S. 35).

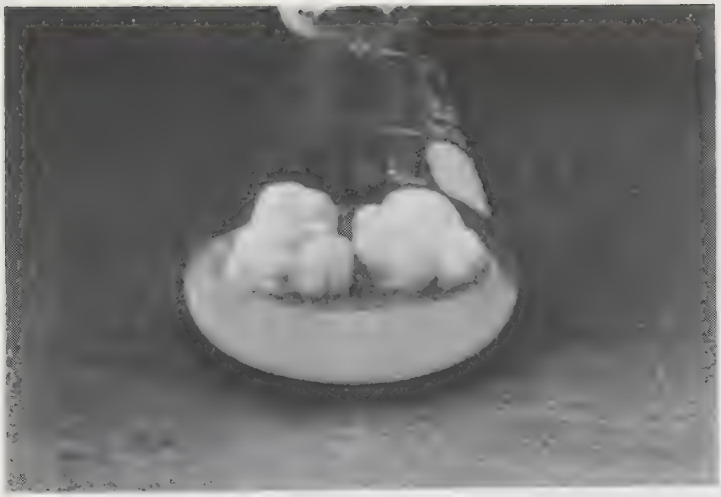


Abbildung 10 : Sprosscallus A der Soladulcidin - Sippe

Abbildung 11 : Mutierter Sprosscallus B der Soladulcidin - Sippe

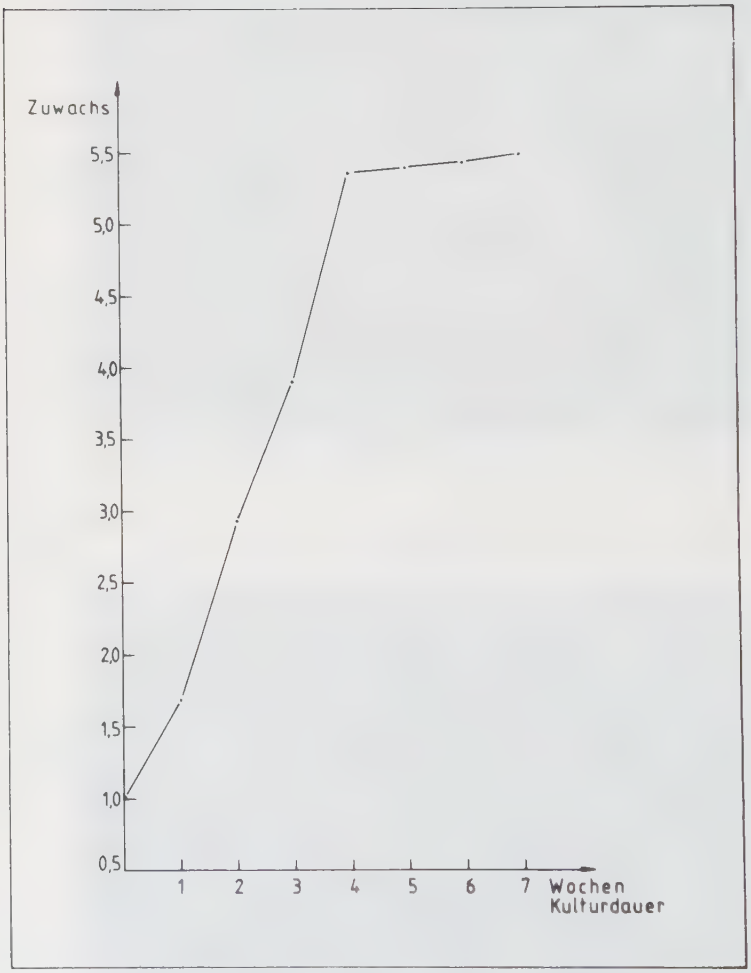


Abbildung 12 : Wachstumskurve des mutierten Sprosscallus' C der Soladulcidin - Sippe;Medium E_6 + Vitamine + 12 % Kokosmilch + GA_3;Dauerdunkel, 12. Passage

Abbildung 13 : Mutierter Sprosscallus C der Soladulcidin - Sippe

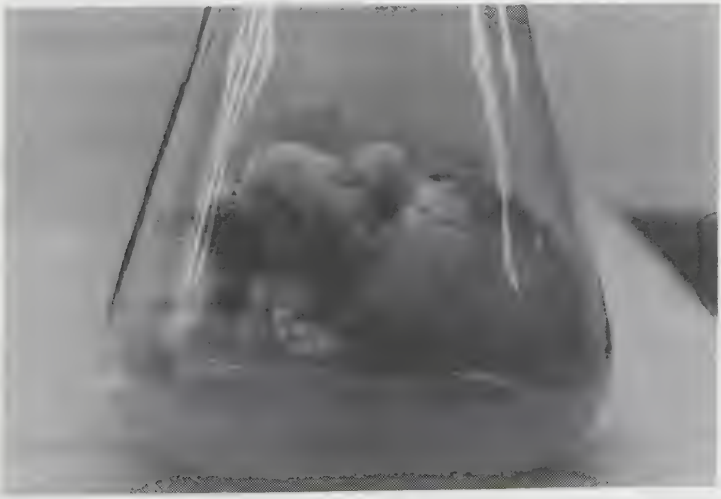


Abbildung 14 : Blattcallus E der Soladulcidin - Sippe

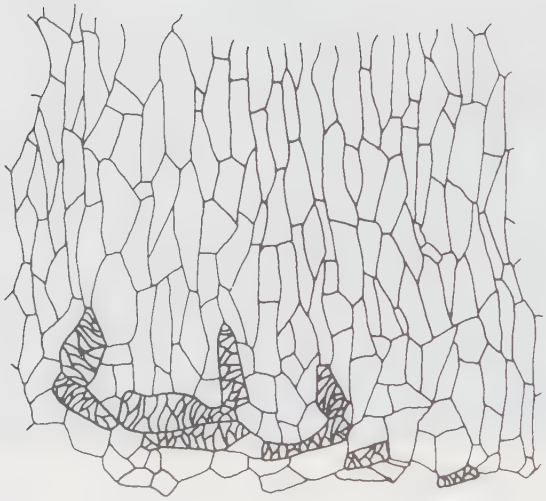


Abbildung 15 : Radialschnitt durch eine Sprosscallus - Mutation der Soladulcidin - Sippe;im Inneren gelegentlich tracheidale Elemente,die während der Kultur regeneriert wurden

2.2.1.4. Differenzierungen in den Calli

Die fünf Callusstämme zeigten bis zu ihrer Aberntung äusserlich keine Differenzierungen.Zur Überprüfung eventuell vorhandener Zelldifferenzierungen im Inneren wurden von den einzelnen Calli Radialschnitte angefertigt und das Gewebe mikroskopisch untersucht.
Die Zellen der Calli waren klein und vielfach langgestreckt. In Callus A waren zu keiner Zeit Zelldifferenzierungen zu erkennen.Bei den Mutanten traten jedoch gelegentlich tracheidale Elemente auf,deren Lignifizierung sich durch die Phloroglucin/HCl-Reaktion nachweisen liess (s.Abb. 15).

2.2.2. Solasodin - Sippe

Die auf dem Medium E_6 + 12 % Kokosmilch herangezogenen Primärcalli der Solasodin - Sippe wurden wie bei der Soladulcidin - Sippe beschrieben (s.Abschnitt 2.2.1.,S. 48),zunächst ebenfalls auf diesem Medium weiterkultiviert.Sie wuchsen jedoch schlechter als die der Soladulcidin - Sippe. Auch für sie wurde durch Veränderung des Nährmediums ein verbessertes Wachstum angestrebt.Der Zusatz von Vitaminen sowie von 1 ppm Gibberellinsäure erbrachte keine Förderung des Wachstums,jedoch wurde die Überlebenszeit der Calli deutlich verbessert.Überraschenderweise zeigte sich bei den Spross- und Blattcalli der Solasodin - Sippe,dass bei ihnen durch Weglassen der Kokosmilch aus dem Nährmedium eine geringfügige Wachstumssteigerung erzielt werden konnte.Nach erfolgter Callusinduktion war hier das weitere Wachstum auf einem definierten Medium möglich und sogar günstiger.Mit einem Zuwachs von nur 135 % in vier Wochen blieb das Wachstum jedoch deutlich hinter dem der Calli von den Soladulcidinpflanzen zurück.
Die Calli waren weiss und hart (Abb. 16).Ab der 7. Passage wurden sie braun und durchscheinend und neigten zum Zerfall (Abb. 17).Die Mutation wurde abgetrennt und weiterkultiviert.Sie konnte jedoch auch durch erneuten Zusatz von Kokosmilch nicht über die 11. Passage hinaus am Leben erhalten werden.

Abbildung 16 : Sprosscallus der Solasodin - Sippe

Abbildung 17 : Mutation des Sprosscallus' der Solasodin - Sippe

2.2.3. Zusammenfassung

Die erzeugten Calli sind das Ergebnis der erstmaligen Installierung und Kultivierung einer Calluskultur von S. dulcamara L..Als Nährmedium diente das Medium E_6,das aus den Mineralsalzen,Saccharose und meso - Inosit des BM nach MURASHIGE u. SKOOG bestand,ergänzt durch 2,4 - D,Kinetin,Gibberellinsäure GA_3,Vitamine und 12 % Kokosmilch.Die Kulturen zeigten das beste Wachstum im Dauerdunkel,bei einer Raumtemperatur von 25 $\pm$ 1°C und 65 % Luftfeuchtigkeit.
Es konnten Spross- und Blattcalli sowie drei Mutationen der Sprosscalli der Soladulcidin - Sippe über Jahre hinweg ohne eine Veränderung des Mediums in Kultur gehalten werden.

Der Zuwachs lag zwischen dem 3,1fachen (für den Blattcallus) und dem 5,5fachen (für die Mutation C des Sprosscallus') innerhalb von fünf Wochen.Über die Zuwachsraten von Calluskulturen liegen in der Literatur u.a. Angaben über Calli von Silybum marianum vor,die im Dauerlicht innerhalb von 10 Wochen einen Zuwachs um das Zehnfache ihres Ausgangsgewichtes zu verzeichnen hatten.Calluskulturen von Crataegus monogyna erreichten in acht Kulturwochen im Dauerdunkel das Achtfache ihres Ausgangsgewichtes.Kulturen von Valeriana wallichii lieferten das Sechsfache,solche von Gingko biloba in sieben Wochen das Neunfache vom Ausgangsgewicht.Bei Bryonia alba - Calli konnte in zehn Wochen ein Zuwachs um das Siebenfache erzielt werden (SCHRALL 1977).Für Calli

von Solanum laciniatum berichten SUPNIEWSKA u. DOHNAL (1972) über einen Zuwachs von 400 - 500 % innerhalb einer fünf- bis siebenwöchigen Kulturperiode.
Die zur Callusgewinnung herangezogenen Klonpflanzen zeigten unterschiedliche Ansprüche an das Medium.

Für die chemischen Analysen wurde nur Gewebe von Sprosscalli der Soladulcidin - Sippe verwendet.

II. Untersuchungen zur Steroidführung des Callusgewebes

1. Isolierung und Identifizierung der Triterpenoide und Sterine

1.1. Dc Nachweis von Sterinestern sowie freien Triterpenoiden und Sterinen im Petrolätherextrakt und seinem unverseifbaren Anteil

Zur Isolierung der triterpenoiden Steroidvorstufen und der Sterine wurden 300 g des gefriergetrockneten und gemahlenen Sprosscallus' A der Soladulcidin - Sippe (s.S. 53) im Soxhlet mit Petroläther (40 - 60°C) erschöpfend extrahiert.Die Ausbeute an petrolätherlöslichen Lipiden betrug 5,6 g (≙ 1,87 % des Callustrockengewichtes).
Der Petrolätherextrakt wurde dünnschichtchromatographisch* mit dem Fliessmittel Petroläther/Essigsäureäthylester/Benzol (85 : 15 : 5;v : v : v) über Kieselgelplatten aufgetrennt (System I,S. 159).In diesem Trennsystem lassen sich Sterinester,Triterpenoide und Sterine differenzieren,deren Lage im Chromatogramm durch Mitlaufen von Vergleichssubstan-

---

* Im folgenden wird für dünnschichtchromatographisch und Dünnschichtchromatogramm die Abkürzung dc bzw. DC verwendet,für gaschromatographisch und Gaschromatogramm gc bzw. GC

zen aus diesen Stoffgruppen ermittelt wurde.Als Detektionsmittel dienten LIEBERMANN - BURCHARD - Reagenz und Molybdatophosphorsäure,mit denen sich die Triterpenoide braun bzw. braunviolett und die Sterine blau bzw. blauviolett färben. Wie Abbildung 18 zeigt,führt der Callus sowohl veresterte

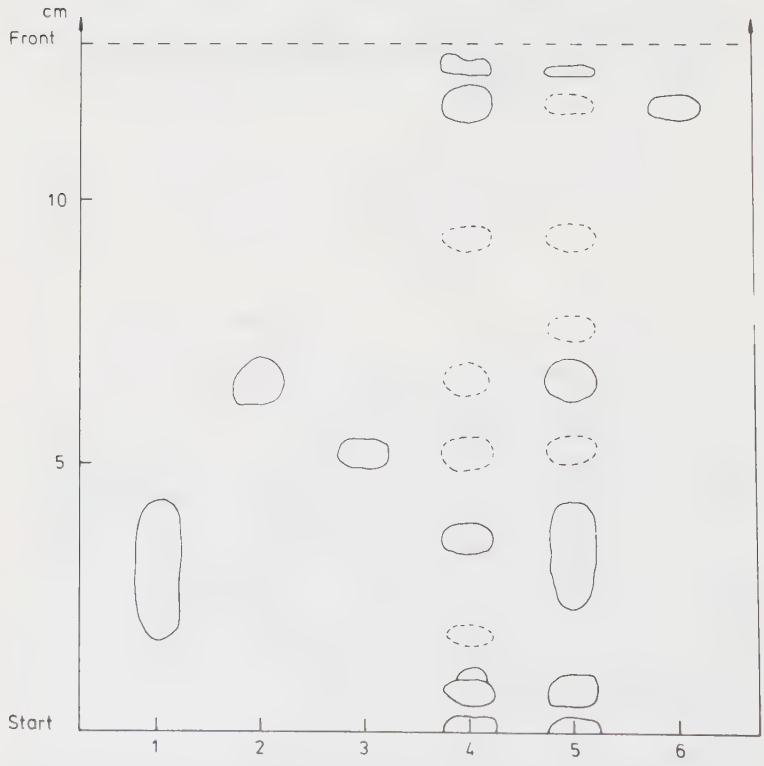


Abbildung 18 : DC des Petrolätherextraktes und seines unverseifbaren Anteiles aus dem Callusgewebe von S. dulcamara
1 = Steringemisch ; 2 = Cycloartenol ; 3 = Lophenol ; 4 = Petrolätherextrakt ; 5 = unverseifb. Anteil ; 6 = Cholesterinoleat (System I,s.Exp.Teil,S. 159)

als auch frei vorliegende Sterine und Triterpenoide.Auf der Höhe der mitgelaufenen Lophenole (4α - Methylsterine) erschien als Spur ebenfalls ein Fleck,der sich wie diese braun bzw. braunviolett färbte.
Zur Identifizierung der mit Petroläther extrahierten freien Fettsäuren des Callus' wurden diese dem Extrakt durch Ausschütteln mit einer Sodalösung entzogen (s.Exp.Teil, S. 190).Hierbei fielen 0,17 g freie Fettsäuren an,deren Analyse auf S. 146 beschrieben wird.
Danach wurde der von den frei vorliegenden Fettsäuren befreite Petrolätherauszug mit methanolischer Kalilauge hydrolysiert und aus dem Hydrolysat der unverseifbare Anteil mit Petroläther und Petroläther/Äther - Gemischen ausgeschüttelt (s.Exp.Teil,S. 179).Die Ausbeute an Unverseifbarem betrug 0,63 g (≙ 0,21 % vom Callustrockengewicht).
Zur Gewinnung der durch die Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren wurde das ausgeschüttelte Hydrolysat anschliessend mit konz. HCl angesäuert und die Fettsäuren mit Petroläther aus der sauren Lösung ausgezogen.Auf diese Weise wurden 1,78 g im Callus gebunden vorliegende Fettsäuren gewonnen,deren Analyse ebenfalls auf S. 146 ff beschrieben wird.

Die dc Analyse des unverseifbaren Anteiles ergab,dass hier als Hauptkomponenten Sterine und Triterpenoide vorliegen (s.Abb. 18).

1.2. Säulenchromatographische Auftrennung des unverseifbaren Anteiles des Petrolätherextraktes

Zur Isolierung der Sterine und Triterpene aus dem unverseifbaren Anteil wurde dieser an 60 g Kieselgel mit Petroläther (100 ml) und Petroläther/Äther - Gemischen,in denen der Ätheranteil nach jeweils 100 ml um 10 % erhöht wurde,säulenchromatographisch aufgetrennt.Nachdem die Sterine die Säule

Tabelle 6 : Säulenchromatographie des unverseifbaren Anteiles (630 mg) aus dem Petrolätherextrakt des Callusgewebes von S. dulcamara

Fraktion	vereinigt zu Fraktion	Zusammensetzung	Rückstand (mg)
1 - 24		-	-
25 - 35		nicht identifiziert	102
36 - 39		Triterpene,unrein	13
40 - 43	I	Triterpene,Lophenole	32
44 - 45		Triterpene,Lophenole, Sterine	39
46 - 49	II	Sterine,rein	367
50 - 53	III	Sterine,unrein	31
Rest		nicht identifiziert	18
			602

verlassen hatten,wurde diese mit Methanol leergewaschen. Tabelle 6 gibt das Ergebnis dieser Trennung wieder. Über die Hälfte des unverseifbaren Anteiles wird danach von den Sterinen gebildet,deren Hauptmenge in den zu Fraktion II vereinigten Fraktionen 46 - 49 bereits kristallin und dc einheitlich erhalten wurde.Die Triterpene fielen bei dieser Auftrennung noch mit Lophenolen und Sterinen verunreinigt an und wurden zu einer Fraktion (I) vereinigt.Die Gesamtmenge von 84 mg dieser Fraktionen beträgt nur 13 % des Unverseifbaren.

1.3. Isolierung und gc Analyse der Triterpene

Aus der nach der Säulenchromatographie erhaltenen,noch verunreinigten Triterpenfraktion (Fraktion I , 84 mg) wurden durch präparative Schichtchromatographie in System I die Triterpene dc einheitlich isoliert.Nach Umkristallisation aus Aceton fielen 2,9 mg farbloser Kristalle an.Im DC (System I) stimmten sie nach Laufhöhe und Färbung mit LIEBERMANN - BURCHARD - Reagenz bzw. Molybdato - H_3PO_4 mit den Vergleichssubstanzen Cycloartenol,24 - Methylencycloartanol,Cycloeucalenol und Obtusifoliol überein (hRf - Wert : 52;braun bzw. bräunlich - violett).Im DC lassen sich diese Triterpene nicht voneinander trennen.Die weitere Analyse erfolgte daher gc an einer Silikongummi - Säule SE 30. Das Gaschromatogramm (Abb. 19) ergab,dass es sich bei den

isolierten Triterpenen um ein Gemisch aus vier Komponenten handelte.Durch Vergleich mit den authentischen Verbindungen wurden sie als Obtusifoliol,Cycloeucalenol,Cycloartenol und 24 - Methylencycloartanol identifiziert.Mit 80,8 % stellt Cycloartenol in dem Gemisch die Hauptkomponente (s. Tab. 9,S. 90) dar.

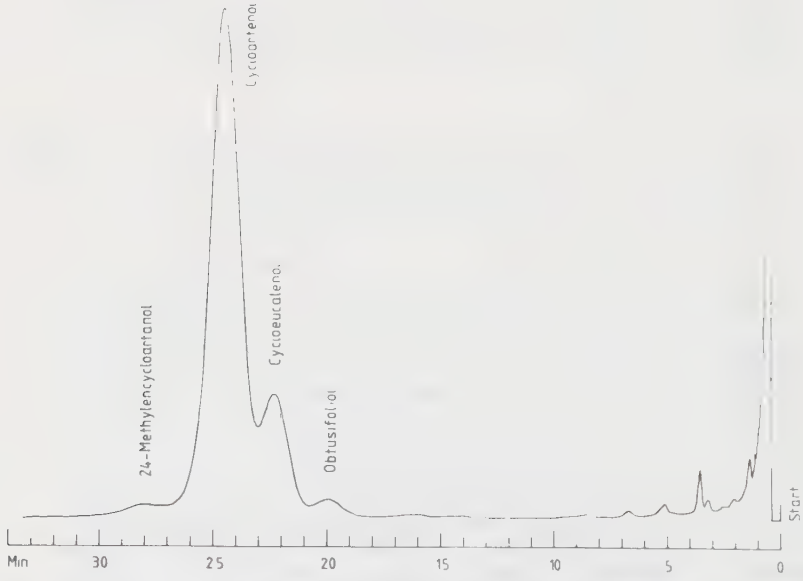


Abbildung 19 : GC der Callus - Triterpene aus dem Unverseifbaren des Petrolätherextraktes
(Säule : Silikongummi SE 30,System I,s.Exp.Teil,S. 159)

Zur Absicherung des Ergebnisses wurden die Triterpene mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert und die Acetylderivate an der Silikongummi - Säule SE 30 und einer OV 17 - Säule

aufgetrennt.Auf der SE 30 - Säule erschienen hier nur drei peaks,da die Acetate von Cycloartenol und Cycloeucalenol in diesem System dieselben Retentionszeiten aufweisen (Tab. 7). Auf der OV 17 - Säule traten wiederum vier peaks auf,die durch Zuspritzen der Vergleichssubstanzen als Obtusifoliolacetat,Cycloeucalenolacetat,Cycloartenolacetat und 24 - Methylencycloartanolacetat identifiziert wurden (Tab. 7).

Tabelle 7 : Relative Retentionszeiten (RRT) und quantitative Zusammensetzung der aus dem Callusgewebe isolierten Triterpene (RT der Bezugssubstanz Cholesterin bzw. Cholesterinacetat : SE 30 : 12,6 Min. bzw. 16,7 Min.;OV 17 : Cholesterinacetat 23,8 Min.)

Triterpene	SE 30		OV 17	Anteil in %
	Alkohol (RRT)	Acetat (RRT)	Acetat (RRT)	
Obtusifoliol	1,57	1,56	1,35	2,0
Cycloeucalenol	1,77	1,65	1,61	16,6
Cycloartenol	1,94	1,65	1,95	80,8
24 - Methylen-cycloartanol	2,13	1,97	2,12	0,6

Nach der gc Analyse der freien Triterpene und ihrer Acetylderivate an zwei Säulen handelt es sich bei den aus dem Callusgewebe isolierten Triterpenen um Cycloartenol (80,8 %), das von dem 4,4',14 - Trimethylsterin 24 - Methylencycloartanol und den beiden 4,14 - Dimethylsterinen Cycloeucalenol

und Obtusifolio1 begleitet wird (Strukturformeln s.Abb. 3,

Identifizierung der Sterine

Die bei der Säulenchromatographie des unverseifbaren Anteiles in Fraktion II anfallenden Sterine ergaben mit dem Reagenz nach LIEBERMANN - BURCHARD die für Δ^5 - Sterine charakteristische Farbreaktion.Der Schmelzpunkt von 131°C entsprach dem des aus Blättern von S. dulcamara isolierten Steringemisches (131 - 132°C ; WILLUHN u. KÖSTENS 1974).Zur weiteren Charakterisierung wurde von den isolierten Sterinen ein IR - Spektrum aufgenommen.Es zeigte Absorptionsbanden bei 1035 , 1022 (Schulter), 878 und 838 cm^{-1},die für Δ^5 - Sterine charakteristisch sind (IDLER et al. 1962 in Doublett bei 1382 und 1370 cm^{-1} ist für die Anwesenheit einer Isopropylgruppe kennzeichnend.Das Spektrum war identisch mit dem eines zum Vergleich aufgenommenen Gemisches der Δ^5 - Sterine Cholesterin,Sitosterin und Stigmasterin Während sich die IR - Spektren der einzelnen Δ^5 - Sterine nur wenig voneinander unterscheiden,gibt sich Stigmasterin durch eine Bande bei 930 cm^{-1} zu erkennen,die auf die hier vorliegende Δ^{22} - Doppelbindung in der Seitenkette zurückzuführen ist (JOHNSON et al. 1957).Diese Bande war bei den isolierten Sterinen nur wenig ausgeprägt,so dass Sterine mit einer Δ^{22} - Doppelbindung nur in geringer Menge im den

Steringemisch vorliegen dürften.
Dc waren die isolierten Sterine in mehreren Systemen einheitlich und in Lauhöhe und Färbung mit Molybdato - H_3PO_4 (blau violett) mit einem aus S. dulcamara - Blättern isolierten Gemisch verschiedener Δ^5 - Sterine (Cholesterin,Campesterin 24 - Methylencholesterin,Brassicasterin,Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin) identisch,die sich hier nicht differenzieren lassen (System I , II und III,s.Exp.Teil,S. hRf - Werte 17 , 40 und 83).

Eine Auftrennung von Steringemischen nach Anzahl und Lage der Doppelbindungen ist über ihre Acetylderivate an silbernitratimprägnierten Kieselgel - Schichten möglich (u.a. VROMAN u. COHEN 1967;EVANS 1973;WILLUHN u. KÖSTENS 1974) Zu diesem Zweck wurden einige mg der isolierten Sterine mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert und auf silbernitrathaltigen Kieselgel - Platten mit n - Hexan/Benzol (1 : 1) aufgetrennt.Auf der Platte traten fünf deutlich voneinander differenzierte Flecke auf (Abb. 20).Der Hauptfleck mit dem grössten hRf - Wert (55) stimmte mit dem mitchromatographierten Gemisch der Acetate von Cholesterin,Campesterin,Sitosterin und Stigmasterin überein.Zwei weitere Flecke waren mit mitgelaufenem Isofucosterin- und 24 - Methylencholesterinacetat identisch (hRf 32 bzw. 16).In Spuren erschienen darunter noch zwei weitere Komponenten,die wegen fehlender Vergleichssubstanzen nicht zugeordnet werden konnten.

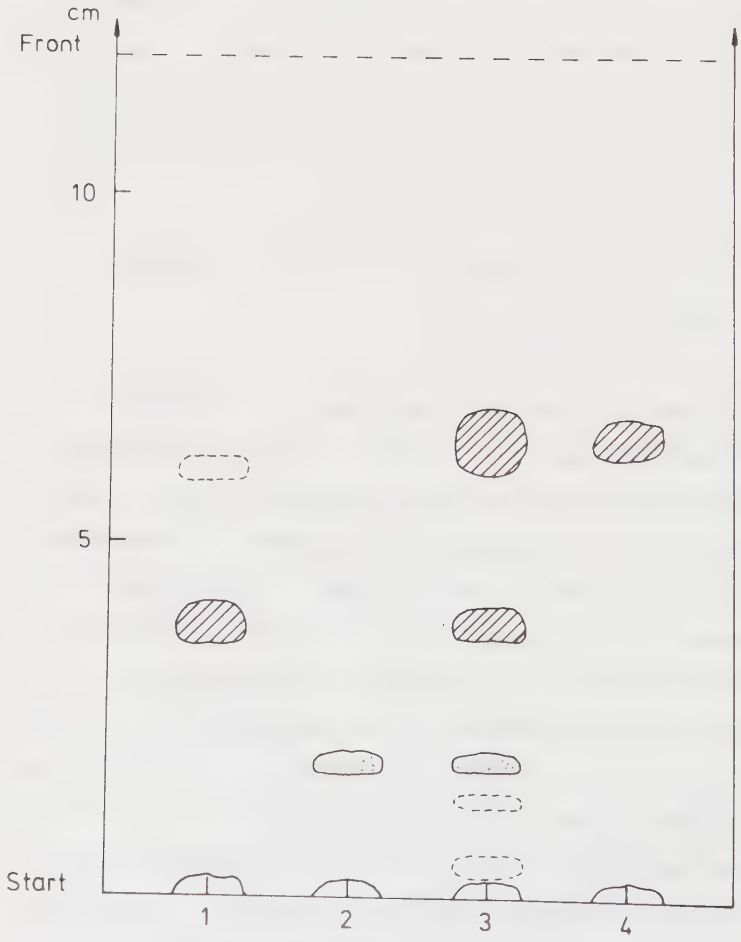


Abbildung 20 : DC der acetylierten Callus - Sterine aus dem Unverseifbaren des Petrolätherextraktes
1 = Isofucosterinacetat ; 2 = 24 - Methylencholesterinacetat ; 3 = acetylierte Callus - Sterine ; 4 = Gemisch aus Cholesterin-,Brassicasterin-,Campesterin-,Stigmasterin- und Sitosterinacetat (System IV,s.Exp.Teil,S. 160)

Die Identifizierung einzelner Komponenten in den meist komplex zusammengesetzten Steringemischen ist erst durch die GC - sowie die GC/MS - Analyse möglich geworden.Die weitere Identifizierung der isolierten Sterine erfolgte daher durch gc Analyse der freien Sterine und ihrer Acetylderivate an den Silikongummi bzw. -ölsäulen SE 30 und OV 17,die für die Analyse von Sterinen allgemein gebräuchlich sind.An der OV 17 - Säule traten sowohl bei den freien Sterinen als auch bei ihren Acetylderivaten im Fraktogramm fünf peaks auf,die durch Zumischen der Vergleichssubstanzen als Cholesterin,

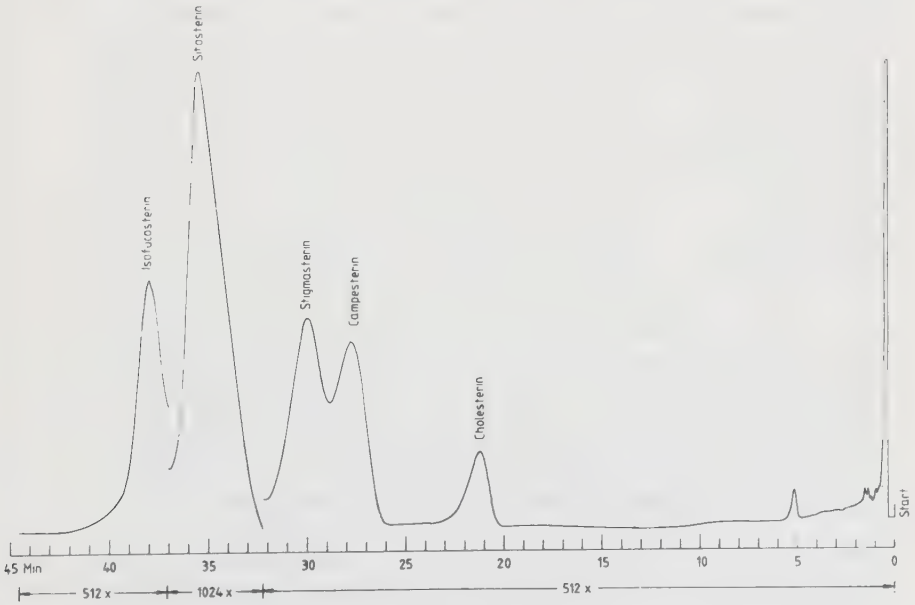


Abbildung 21 : GC der Sterine aus dem Unverseifbaren des Petrolätherextraktes
(Säule : Silikonöl OV 17,System II,s.Exp.Teil,S. 160)

Campesterin,Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin identifiziert wurden (s.Abb. 21 und Tab. 8).

Tabelle 8 : Relative Retentionszeiten der aus dem Callusgewebe isolierten Sterine und ihrer Acetylderivate,bezogen auf Cholesterin bzw. Cholesterinacetat
(RT der Bezugssubstanzen Cholesterin bzw. Cholesterinacetat : SE 30 : 12,6 bzw. 16,8 Min. ;OV 17 : 21,2 bzw. 23,8 Min.)

Sterine	SE 30		OV 17	
	Alkohol	Acetat	Alkohol	Acetat
Cholesterin	1,00	1,00	1,00	1,00
Campesterin	1,27	1,29	1,30	1,30
24 - Methylencholesterin	1,27	1,29	1,34	1,28
Stigmasterin	1,36	1,38	1,38	1,40
Sitosterin	1,58	1,69	1,64	1,61
Isofucosterin	1,58	1,69	1,81	1,74

Das dc nachgewiesene 24 - Methylencholesterin,dessen Retentionszeit auf der OV 17 - Säule bei den freien Sterinen zwischen der von Campesterin und Stigmasterin liegt,wurde von den peaks dieser beiden Sterine überlagert.Auf der SE 30 - Säule besitzen Campesterin und 24 - Methylencholesterin wie auch ihre Acetate dieselbe Retentionszeit.Das gleiche gilt auch für das Sterinpaar Sitosterin und Isofucosterin,so dass auf dieser Säule nur vier peaks erscheinen, die mit Cholesterin,Campesterin/24 - Methylencholesterin,

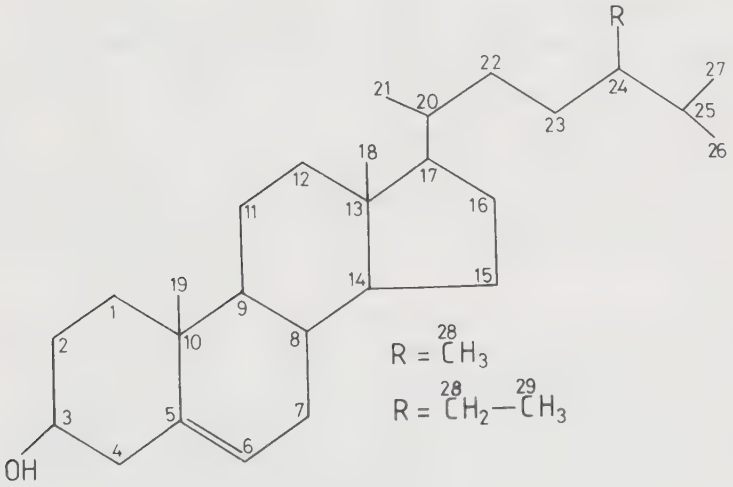
Stigmasterin und Sitosterin/Isofucosterin identisch waren (s.Tab. 8).

Gaschromatographisch getrennte Sterine können direkt aus dem Gaschromatographen in ein Massenspektrometer eingeleitet und dort analysiert werden (u.a. SPITELLER 1966;KNIGHTS 1967;WYLLIE u. DJERASSI 1968;ITOH et al. 1973;JEONG et al. 1974).
Sterine geben im Massenspektrum einen Molekülpeak.Immer auftretende Spaltungsprodukte resultieren aus der Sprengung der von den quartären C - Atomen 10 und 13 ausgehenden Bindung.Werden nur die angulären Methylgruppen eliminiert,so führt dies zur Bildung eines Fragmentes M - 15.Als Hydroxysteroide neigen die Sterine weiterhin zur Abspaltung von Wasser,so dass als Bruchstücke die Ionen M - H_2O und M - (CH_3 + H_2O) auftreten.Weitere charakteristische Bruchstücke der Δ^5 - Sterine sind : M - [H_2O + 67 (= C_2H_7)] ; M - [H_2O + 93 (= C_7H_9)] und M - [H_2O + 121 (= C_9H_{13})] (s. KNIGHTS 1967).Anhand der Molpeaks und der genannten Fragmente lassen sich die pflanzlichen Δ^5 - Sterine identifizieren.Da bei diesen Spaltungsprodukten die für die verschiedenen Sterine charakteristische Seitenkette erhalten bleibt,unterscheiden sich die Massenzahlen dieser Fragmente stets nur durch die Differenz der Massenunterschiede ihrer Seitenkette.Desweiteren tritt eine Anzahl von Ionen auf,die für Δ^5 - Sterine charakteristisch sind.Es handelt sich dabei um das Fragment m/e 273,das durch Abspaltung der Seiten-

kette am C-17 gebildet wird (M - Seitenkette).Durch zusätzliches Abspalten von Wasser aus dem Sterinkern entsteht das Fragment m/e 259,d.h. M - (Seitenkette + H_2O).Weiterhin erfolgt bei den Sterinen leicht eine Spaltung zwischen den C - Atomen 13 und 17.Dieses Primärspaltungsprodukt wird weiter abgebaut,wobei am häufigsten ein Bruch zwischen der Bindung C-14 und C-15 stattfindet (SPITELLER 1966).Als Spaltprodukte resultieren die Fragmente 231 und 213,d.h. M - (Seitenkette + 42) bzw. M - (Seitenkette + 42 + H_2O).Das Primärspaltungsprodukt kann jedoch auch durch einen Bruch zwischen C-15 und C-16 weiter abgebaut werden,woraus Spaltprodukte mit den Massenzahlen 246 und 229 resultieren,d.h. M - (Seitenkette + 27) bzw. M - (Seitenkette + 27 + H_2O). Die Ionen m/e 273 , 255 , 246 , 231 , 229 und 213 sind so allen Δ^5 - Sterinen gemeinsam.

Δ^5 - Sterine,die in der Seitenkette eine Doppelbindung tragen (z.B. Stigmasterin : Δ^{22} ; 24 - Methylencholesterin und Isofucosterin : $\Delta^{24(28)}$),geben sich im Massenspektrum durch das Fragment 271 zu erkennen,das durch Verlust der Seitenkette an C-17 unter gleichzeitiger Umlagerung zweier H - Atome gebildet wird.Ausserdem treten bei ihnen charakteristische peaks bei 314 , 296 und 281 Masseneinheiten auf, die durch Verlust nur eines Teiles der Seitenkette entstehen und durch eine McLafferty - Umlagerung formuliert werden können.Das Fragment 314 entspricht so M - C_{23} bis C_{27} + 1x H_2O.Bei den Δ^5 - Sterinen mit einer $\Delta^{24(28)}$ -

Doppelbindung in der Seitenkette hat dieser peak eine grössere Intensität als das Fragment bei m/e 271 und ist so charakteristisch für Δ^{5} , $^{24(28)}$- Sterine (ITOH et al. 1973;KNIGHTS 1967;WYLLIE u. DJERASSI 1968).Die Fragmente m/e 296 und 281 können davon ausgehend folgendermassen formuliert werden : M - (C_{23} bis C_{27} + H_2O) bzw. M - (C_{23} bis C_{27} + H_2O + CH_3).



Struktur der Δ^{5} - Sterine

Die aus dem Callus isolierten Sterine wurden zur Absicherung des gc Analysenergebnisses einer kombinierten GC/MS - Analyse (OV 17 - und OV 1 - Säule) unterworfen.In den Spektren der fünf durch Vergleichssubstanzen identifizierten peaks traten als Hauptionen oberhalb von 200 Masseneinheiten die für Δ^{5} - Sterine typischen Fragmente mit den Massenzahlen 273 , 255 , 231 und 213 auf.Als für die einzelnen Sterine charak-

teristische Bruchstücke wurden als Hauptionen gefunden :

Cholesterin : m/e 386 = M^+ ; 368 = M - H_2O ; 353 = M - (CH_3 + H_2O) ; 301 = M - (H_2O + 67) ; 275 = M - (H_2O + 93) und 247 = M - (H_2O + 121).

Campesterin : m/e 400 = M^+ ; 385 = M - CH_3 ; 382 = M - H_2O ; 367 = M - (CH_3 + H_2O) ; 315 = (H_2O + 67) ; 289 = M - (H_2O + 93) und 261 = M - (H_2O + 121).

Stigmasterin : m/e 412 = M^+ ; 394 = M - H_2O ; 369 = M - 43 (C_{25} - C_7) ; 351 = M - (H_2O + 43) ; 301 = M - (H_2O + 93) ; 314 = M - (Teil der Seitenkette + 1x H) (C_{23} - C_{27} + 1x H) ; 299 = M - (15 + C_{23} - C_{27} + 1x H) ; 271 = M - (Seitenkette + 2x H),stärker als m/e 314 ; 253 = M - (Seitenkette + 2x H + H_2O).

Sitosterin : m/e 414 = M^+ ; 399 = M - CH_3 ; 396 = M - H_2O ; 381 = M - (H_2O + CH_3) ; 275 = M - (H_2O + 121).

Isofucosterin : m/e 412 = M^+ ; 397 = M - CH_3 ; 394 = M - H_2O ; 379 = M - (CH_3 + H_2O) ; 314 = M - (Teil der Seitenkette + 1x H)(C_{23} - C_{27} + 1x H),stärker als m/e 271 = M - (Seitenkette + 2x H) und 281 = M - (CH_3 + H_2O + Teil der Seitenkette (C_{23} - C_{27}) + 1x H).

Um die Anwesenheit des im DC nachgewiesenen und im GC von Campesterin und Stigmasterin überlagerten 24 - Methylencholesterins zu überprüfen,wurde ein Massenspektrum aus dem Bereich des absteigenden Campesterinpeaks aufgenommen.In diesem Spektrum (Abb. 22),dessen Hauptfragmente vom Campesterin stammen,trat bei m/e 398 der Molekülpeak von 24 -

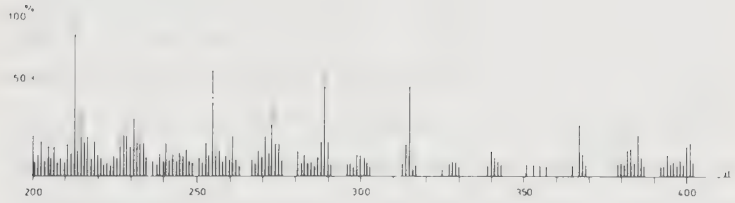


Abbildung 22 : Massenspektrum aus dem Bereich des absteigenden Campesterinpeaks mit Molekülpeak (m/e 398) und Massenfragmenten von 24 - Methylencholesterin

Methylencholesterin auf.Der kleine peak mit der Massenzahl 412 ist der Molekülpeak des im GC auf Campesterin folgenden Stigmasterins,das somit ebenfalls in diesem Spektrum erfasst wurde.Neben dem Molpeak gibt sich die Anwesenheit von 24 - Methylencholesterin durch die Massenzahlen 383 , 380 , 365 und 313 zu erkennen,bei denen es sich um dieselben,jedoch um zwei Massenzahlen kleineren Fragmente handelt,wie sie für Campesterin diskutiert worden sind.Die Massenzahlen 314 , 296 , 281 und 271 sind typisch für Δ^5 - Sterine mit einer ungesättigten Seitenkette.Sie können hier sowohl vom 24 - Methylencholesterin als auch vom Stigmasterin stammen. Der geringe Intensitätunterschied zwischen den Massenzahlen 271 und 314 spricht dafür,dass beide Sterine an der Bildung

dieses Fragmentes beteiligt sind,so dass auch diese Fragmente für das Vorliegen von 24 - Methylencholesterin sprechen.

Auf Grund der durchgeführten dc,gc und massenspektrometrischen Untersuchungen handelt es sich bei den aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes des Callusgewebes isolierten Sterinen um Cholesterin,Campesterin,24 - Methylencholesterin,Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin (Formelbilder s.Abb. 3,S. 12).Die quantitative Zusammensetzung des Steringemisches ist in Tabelle 9,S. 90 angegeben.

1.5. Qualitative Zusammensetzung der ungebundenen Sterine im Callus

Bei den im Petrolätherauszug des Callus' erfassten Sterinen handelt es sich um frei und verestert vorliegende Sterine, die im unverseifbaren Anteil zusammen erfasst wurden.Bei den Untersuchungen zum dc Nachweis von neutralen und basischen Steroidsapogeninen im Callus (s.S. 94 ff) wurde der Callus mit Methanol extrahiert und der Methanolextrakt durch Ausschütteln mit Petroläther entfettet (s.Exp.Teil,S. 186).Im DC dieses Petrolätherauszuges liessen sich Sterine und Triterpene nachweisen (System I,s.Exp.Teil,S. 159),die im Callus ungebunden vorgelegen haben müssen.Die Sterine wurden durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel 60 - Autofolien (Merck) im System I isoliert (10,8 mg) und als

freie Sterine sowie nach ihrer Acetylierung als Acetate gc an der OV 17 - und der SE 30 - Säule wie bereits beschrieben analysiert.Danach bilden die im Callus frei vorliegenden Sterine ein Gemisch aus Cholesterin,Campesterin (und 24 - Methylencholesterin?),Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin Die quantitative Zusammensetzung des Steringemisches unterschied sich deutlich von dem aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes isolierten Steringemisch.Sie ist in Tabelle 9,S. 90 zusammengefasst.

1.6. Nachweis von Steringlykosiden und Acyl - Steringlykosiden im Callus

Neben freien Sterinen und deren Estern sind von KÖSTENS u. WILLUHN (1973) in S. dulcamara Steringlykoside und Acyl Steringlykoside identifiziert worden.Während die ersteren mit Petroläther extrahiert werden können,fallen die stärker polaren Glykoside und Acylglykoside erst bei der Extraktion mit hydrophileren Lösungsmitteln an.Zu ihrem Nachweis und ihrer Isolierung wurden 294 g des mit Petroläther zuvor entfetteten Calluspulvers im Soxhlet drei Tage lang mit Aceto extrahiert.Während der Extraktion bildete sich im Kolben ein Niederschlag.Er wurde vor dem Einengen des Extraktes ab filtriert (Ausbeute : 3,90 g).Der Rückstand des Acetonfiltrates betrug 2,72 g.Insgesamt betrug der mit Aceton aus dem entfetteten Callus extrahierbare Anteil somit 6,62 g (

2,25 % vom Callusgewicht).
Steringlykoside und Acyl - Steringlykoside lassen sich dc auf Kieselgel G - Platten mit Chloroform/Methanol (6 : 1) auftrennen (System V,s.Exp.Teil,S. 161).Der Acetonextrakt und der gesondert abgetrennte,in Chloroform/Methanol gelöste Niederschlag wurden zu diesem Zweck in dem genannten System dc untersucht.Als Vergleichssubstanz stand das von KÖSTENS u. WILLUHN (1973) aus S. dulcamara isolierte Steringlykosid zur Verfügung.
Im DC des Acetonextraktes traten neben anderen Komponenten zwei LIEBERMANN - BURCHARD - positive Substanzen mit den hRf - Werten 34 und 59 auf,von denen diejenige mit dem hRf - Wert 34 mit dem mitchromatographierten Steringlykosid übereinstimmte (s.Abb. 23).KÖSTENS u. WILLUHN (1973) geben für Steringlykoside und Acyl - Steringlykoside in diesem System die hRf - Werte 39 bzw. 63 an,EICHENBERGER u. GROB (1970) 43 bzw. 68.Mit Molybdato - H_3PO_4 färbte sich diese Komponente zunächst rötlich,dann blau - violett.Auf der Höhe von Cholesterin und Cholesterinoleat traten in Spuren zwei weitere LIEBERMANN - BURCHARD - positive Substanzen auf,bei denen es sich um nicht vollständig mit Petroläther entfernte freie Sterine und Sterinester handeln dürfte.
In dem abgetrennten Niederschlag liessen sich mit den beiden benutzten Sprühreagenzien dagegen nur die beiden als Steringlykoside und Acyl - Steringlykoside angesehenen Komponenten und wenig freie Sterine anfärben.Zur Isolierung der Sterin- und Acyl - Steringlykoside wurde deshalb von

diesem Niederschlag ausgegangen.

Der Niederschlag wurde an 100 g Kieselgel 60 mit Chloroform,dem pro Liter jeweils 2 % mehr Methanol zugefügt wurde, säulenchromatographisch aufgetrennt.Es wurden Fraktionen zu

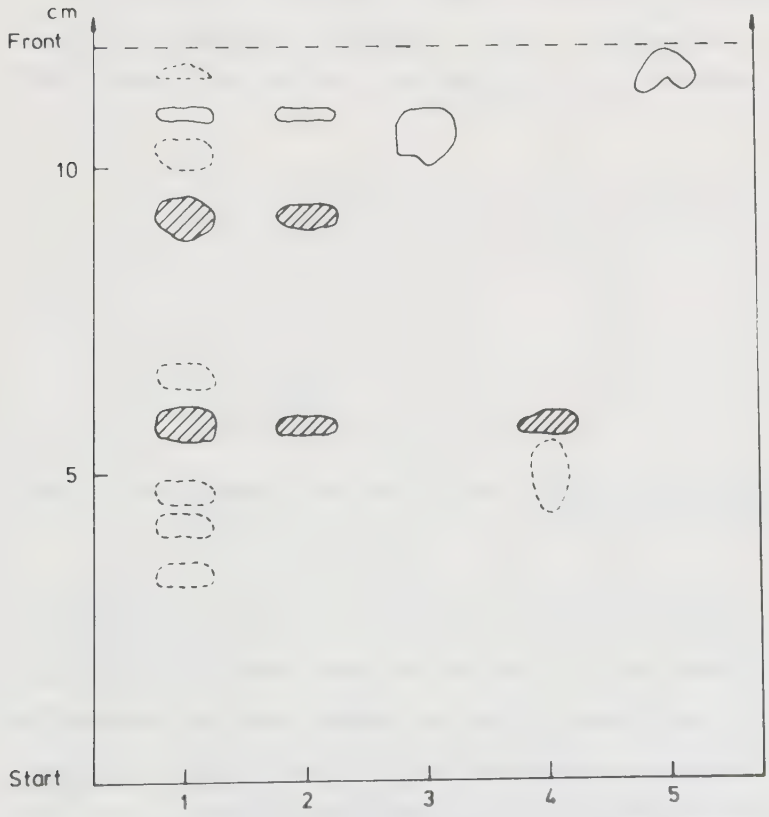


Abbildung 23 : DC der Steringlykoside des Callusgewebes 1 = Acetonextrakt ; 2 = Niederschlag im Acetonextrakt ; 3 = Cholesterin ; 4 = Steringlykoside ; 5 = Cholesterinoleat (System V,s.Exp.Teil,S. 161)

10 - 15 ml aufgefangen und dc in System V untersucht.Bei dieser Auftrennung fielen mehrere Fraktionen an,in denen die Substanz mit dem hRf - Wert 34 praktisch rein vorlag. Diese Fraktionen wurden vereinigt und aus Methanol umkristallisiert (Ausbeute : 19,9 mg).Der Schmelzpunkt der Substanz lag mit 256 - 260°C im Bereich der Steringlykoside (Schmp. 253 - 254°C ; KÖSTENS u. WILLUHN 1973).Das IR - Spektrum (s.Abb. 24) zeigte eine breite,für glykosidische

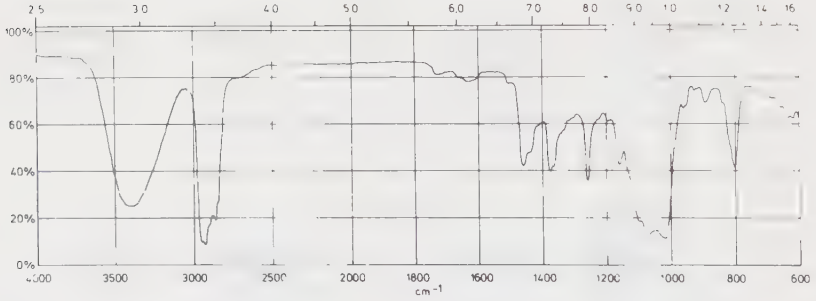


Abbildung 24 : IR - Spektrum der isolierten Steringlykoside aus dem Callusgewebe

Bindungen typische Bande zwischen 1000 und 1150 cm^{-1}.Die im Fingerprintbereich auftretenden Banden der verschiedenen CH - Schwingungen glichen weitgehend denen der Sterine.Das IR - Spektrum stand so mit dem der angenommenen Struktur der Verbindung als Steringlykosid in Einklang.

Zur Gewinnung des Aglykons und der Zuckerkomponente des Glykosides wurden 10 mg sauer verseift und die Sterine dem Hydrolysat mit Petroläther entzogen (Ausbeute : 5 mg).Die

wie bereits beschrieben durchgeführte dc und gc Analyse der freien und acetylierten Sterine an der SE 30 - und der OV 17 - Säule ergab,dass sie ebenfalls ein Gemisch aus Cholesterin, Campesterin (+ 24 - Methylencholesterin),Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin darstellen.

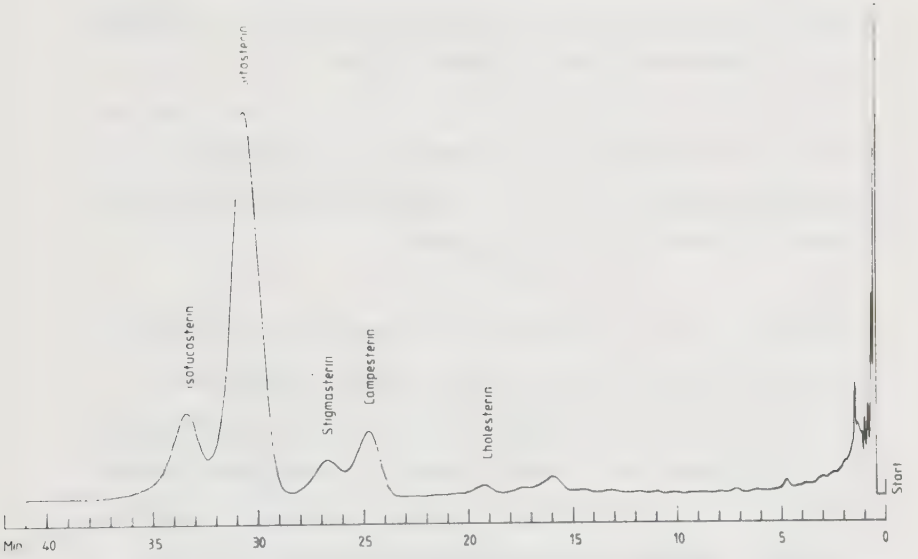


Abbildung 25 : GC der als Glykoside vorliegenden Sterine des Callusgewebes
(Säule : Silikonöl OV 17,System II,s.Exp.Teil,S. 167)

Abbildung 25 zeigt das Gaschromatogramm der an der OV 17 - Säule aufgetrennten,nach Hydrolyse gewonnenen Sterine.Die daraus ermittelte quantitative Zusammensetzung ist in Tabelle 9,S. 90 wiedergegeben.

Die von den Sterinen befreite,saure Hydrolyseflüssigkeit

wurde durch Schütteln mit stark basischem Ionenaustauscher neutralisiert,filtriert und zum dc Nachweis der Zucker im Vakuum eingeengt.Als Trennsystem diente das Fliessmittelgemisch nach WALDI (1965) (n - Butanol/Aceton/Phosphatpufferlösung auf Kieselgur G - Schichten;System VI,s.Exp.Teil,S. 161).Anhand von Vergleichssubstanzen liess sich der aus dem Glykosid abgespaltene Zucker nach Detektion mit Anisaldehyd - H_2SO_4 als Galaktose identifizieren (s.Abb. 26).
Auf Grund dieser Analysen handelte es sich bei den aus dem Callus isolierten Steringlykosiden um die Galaktoside von Cholesterin,Campesterin (+ 24 - Methylencholesterin),Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin.

Von der als Acyl - Steringlykosid angesprochenen Substanz mit dem hRf - Wert 59 fiel bei der Säulenchromatographie eine Fraktion von 17 mg an,die noch mit zwei sich mit Molybdato - H_3PO_4 gelblich - braun färbenden Komponenten verunreinigt war.Sie wurde deshalb an zwei Kieselgel - Alufolien in System V präparativ gereinigt.Danach lagen 7 mg der noch immer nicht vollständig reinen Substanz vor.Zum Nachweis der vermuteten Sterine,Fettsäuren und Zucker wurde die Substanz in 20 ml 2 N HCl hydrolysiert.Durch Extraktion des Hydrolysates mit Petroläther wurden die Sterine und Fettsäuren abgetrennt und daraus die Fettsäuren durch Ausschütteln mit Sodalösung entfernt.Die mit Na_2SO_4 sicc. getrockneten Petrolätherphasen wurden eingeengt und der Rückstand an einer OV 17 - Säule gc untersucht.Im GC erschienen

die Sterine Cholesterin,Campesterin,Stigmasterin und Sitosterin,deren prozentuale Anteile an der Fraktion in Tabelle 9,S. 90 wiedergegeben sind.Isofucosterin konnte hier nicht nachgewiesen werden.Desgleichen wurde wegen der zu geringen Menge auch nicht auf das gleichzeitige Vorkommen von 24 -

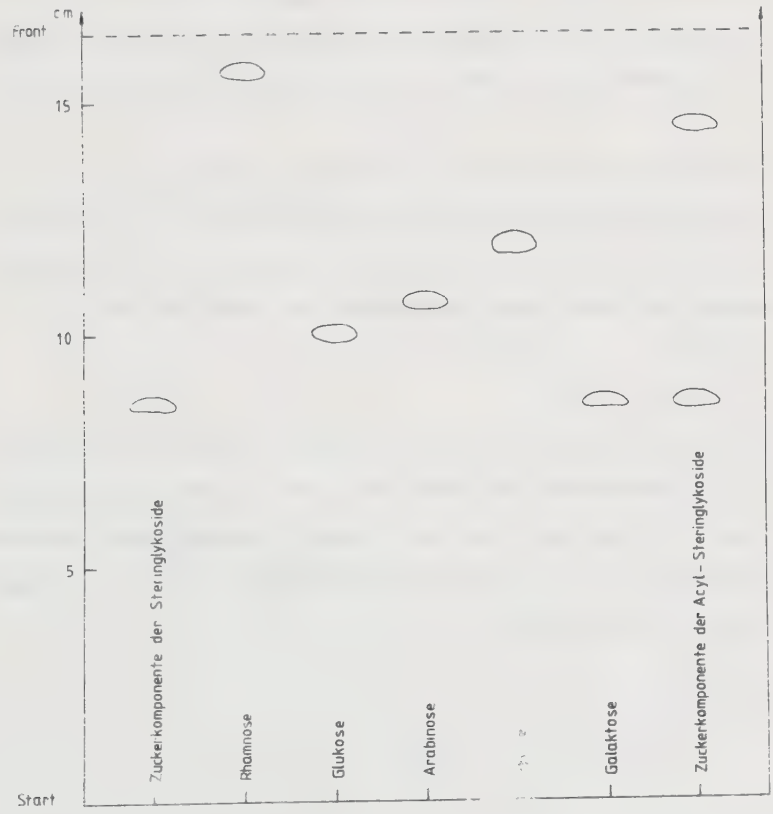


Abbildung 26 : DC der Zuckerkomponente der Steringlykoside und der Acyl - Steringlykoside des allusgewebes (System VI,s.Exp.Teil,S. 161)

Methylencholesterin dc geprüft.
Zur Identifizierung der Fettsäuren wurde die Sodalösung mit konz. HCl angesäuert und mit Petroläther ausgeschüttelt.Die mit Na_2SO_4 sicc. getrocknete Petrolätherausschüttelung wurde zur Trockne gebracht,der Rückstand mit Diazomethan methyliert und gc an einer Diäthylenglycolsuccinat - Säule untersucht.Im Fraktogramm erschien nur ein peak,der mit dem von authentischem Palmitinsäuremethylester übereinstimmte.

Zum Nachweis der Zucker wurde das saure Hydrolysat wie beim Steringlykosid angegeben behandelt und dc in System VI untersucht.Hier liessen sich in Spuren zwei Zucker nachweisen,von denen einer mit Galaktose übereinstimmte (s. Abb. 26).

Durch den Nachweis von Sterinen,Palmitinsäure und Zucker aus der Komponente mit dem hRf - Wert 59 wurde die Vermutung bestätigt,dass ein verestertes Steringlykosid vorliegt, bei dem es sich um die Palmitinsäureester der Sterylgalaktoside handeln dürfte.

die Sterine Cholesterin,Campesterin,Stigmasterin und Sitosterin,deren prozentuale Anteile an der Fraktion in Tabelle 9,S. 90 wiedergegeben sind.Isofucosterin konnte hier nicht nachgewiesen werden.Desgleichen wurde wegen der zu geringen Menge auch nicht auf das gleichzeitige Vorkommen von 24 -

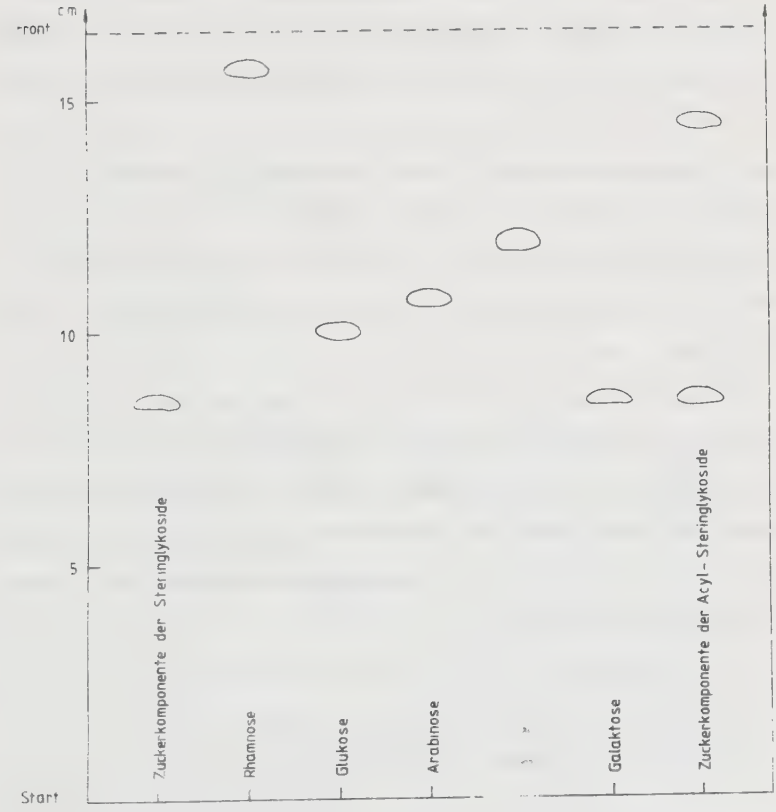


Abbildung 26 : DC der Zuckerkomponente der Steringlykoside und der Acyl - Steringlykoside des allusgewebes (System VI,s.Exp.Teil,S. 161)

Methylencholesterin dc geprüft.
Zur Identifizierung der Fettsäuren wurde die Sodalösung mit konz. HCl angesäuert und mit Petroläther ausgeschüttelt.Die mit Na_2SO_4 sicc. getrocknete Petrolätherausschüttelung wurde zur Trockne gebracht,der Rückstand mit Diazomethan methyliert und gc an einer Diäthylenglycolsuccinat - Säule untersucht.Im Fraktogramm erschien nur ein peak,der mit dem von authentischem Palmitinsäuremethylester übereinstimmte.

Zum Nachweis der Zucker wurde das saure Hydrolysat wie beim Steringlykosid angegeben behandelt und dc in System VI untersucht.Hier liessen sich in Spuren zwei Zucker nachweisen,von denen einer mit Galaktose übereinstimmte (s. Abb. 26).

Durch den Nachweis von Sterinen,Palmitinsäure und Zucker aus der Komponente mit dem hRf - Wert 59 wurde die Vermutung bestätigt,dass ein verestertes Steringlykosid vorliegt, bei dem es sich um die Palmitinsäureester der Sterylgalaktoside handeln dürfte.

1.7. Quantitative Zusammensetzung der aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes isolierten Sterine sowie der frei,als Glykoside und Acyl - Glykoside im Callus vorliegenden Sterine

Zur Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung des isolierten Steringemisches aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes,der frei vorliegenden und der aus der Fraktion der Steringlykoside und Acyl - Steringlykoside isolierten Sterine wurde jeweils das an der OV 17 - Säule erhaltene Fraktogramm der freien Sterine herangezogen.Die Werte wurden über einen an den Gaschromatographen angeschlossenen Integrator bestimmt.Die so ermittelten Werte sind in Tabelle 9 zusammengefasst.Der hier für Campesterin/24 - Methylencholesterin gemeinsam angegebene Wert bezieht sich fast ausschliesslich auf Campesterin,da 24 - Methylencholesterin nach der dc und der GC - MS - Analys in dem Steringemisch nur in Spuren vorkommt.
Sitosterin bildet mit Prozentanteilen von 54 - 77 % in allen Sterinfraktionen das Hauptsterin.Der Campesterinanteil ist stets grösser als der des Stigmasterins.Auffallend ist der sehr hohe Cholesteringehalt bei den frei vorliegenden Sterinen.

Tabelle 9 : Prozentuale Zusammensetzung der Fraktionen der ungebunden vorliegenden Sterine,der Sterine aus dem unverseifbaren Anteil sowie der als Glykoside und Acyl - Glykoside vorliegenden Sterine des Callusgewebes

Sterinfraktion	Cholesterin %	Campesterin/ 24-Methylen-cholesterin %	Stigmasterin %	Sitosterin %	Iso-fucosterin %
ungebundene Sterine	34,5	4,6	3,6	56,3	<1
Sterine aus dem Unverseifbaren	8,0	10,3	6,3	54,0	21,4
Steringlykoside	1,4	9,6	6,1	66,8	16,1
Acyl - Sterin-glykoside	11,0	11,3	0,2	77,5	–

1.8. Quantitative Bestimmung der Gesamtsterine sowie des Anteiles der frei,verestert und glykosidisch gebunden vorliegenden Sterine im Callus

Die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Analysen hatten ergeben,dass im Callus von S. dulcamara die Sterine sowohl frei als auch als Ester,Glykoside und Acyl - Glykoside vorliegen.Im folgenden soll der Gehalt an Gesamtsterinen im Callus bestimmt und die Methode dabei so variiert werden,dass auch Aussagen über den Anteil der freien und veresterten Sterine sowie der Fraktion der polaren Sterinderivate (Glykoside und Acyl - Glykoside) an den Gesamtsterinen möglich sind.

Sterine geben mit LIEBERMANN - BURCHARD - Reagenz eine grünblaue Färbung,deren Intensität bei 680 nm in dem getesteten Bereich von 200 - 800 mg pro 3,1 ml Reagenzlösung (1,0 ml Eisessig , 2,0 ml Essigsäureanhydrid und 0,1 ml konz. H_2SO_4) dem LAMBERT - BEER'schen Gesetz folgt und so für eine photometrische Gehaltsbestimmung herangezogen werden kann (u.a. WALL u. KELLY 1947;EICHENBERGER u. GROB 1970).Im vorliegenden Falle wurde nach den Angaben von WILLUHN u. KÖSTENS (1975) vorgegangen,die mit dieser Methode die quantitative Verteilung der Sterine und Sterinderivate in den einzelnen Organen von S. dulcamara untersucht haben.

Zur Erstellung der Eichkurve (s.Abb. 45,S. 184) wurde das aus dem Callus isolierte Steringemisch herangezogen.Jeweils 0,2 , 0,4 , 0,6 und 0,8 mg dieser Sterine wurden an DC - Alufolien Kieselgel 60 mit Chloroform/Äthanol abs. (99 : 1) chromatographiert (System II,S. 160) und die Sterine mit dem Desaga - Elutor (DIBBERN et al. 1971) in ein Kölbchen eluiert.Nach Abzug des Lösungsmittels wurde dann das Reagenz zugegeben,die Mischung 30 Minuten lang unter häufigem Umschütteln bei 24°C gehalten und schliesslich die Extinktion bei 680 nm gemessen.Die mit den isolierten Sterinen ermittelte Fehlergrenze der Methode lag in dem angegebenen Bereich bei ± 5 % (s.Exp.Teil,S. 183).

Zur Bestimmung der Gesamtsterine wurden 20,o g des gefriergetrockneten und gemahlenen Callus' A im Soxhlet erschöpfend mit Aceton extrahiert,wobei sowohl die freien und veresterten Sterine als auch die polaren Steringlykoside und Acyl - Glykoside erfasst werden.Der Acetonextrakt wurde sauer hydrolysiert und ein aliquoter Teil des Unverseifbaren wie beim Aufstellen der Eichkurve an DC - Alufolien Kieselgel 60 chromatographiert.Die herausgeschnittene Sterinzone wurde mit dem Elutor eluiert und mit dem Reagenz versetzt.Es wurden jeweils vier Parallelbestimmungen durchgeführt und daraus die Gehaltsangabe gemittelt.

Zur Bestimmung der frei und verestert vorliegenden Sterine wurden ebenfalls 20,0 g Callus mit Aceton erschöpfend extrahiert und der Acetonextrakt alkalisch verseift.In dem aus dem Hydrolysat gewonnenen unverseifbaren Anteil fielen

die im Callus frei und verestert vorliegenden Sterine gemeinsam an.Diese wurden wie bei den Gesamtsterinen angegeben photometrisch bestimmt.Die Differenz aus der Bestimmung nach saurer und alkalischer Hydrolyse ergibt den Anteil der im Callus als Glykoside und Acyl - Glykoside vorliegenden Sterine,die sich nur sauer spalten lassen.

Zur Bestimmung der verestert vorliegenden Sterine wurden erneut 20,0 g Callus mit Aceton extrahiert und aus dem Acetonextrakt die freien Sterine zunächst mit Digitonin ausgefällt.Die dann nach alkalischer Hydrolyse im Unverseifbaren bestimmten Sterine entsprechen dem Anteil der veresterten Sterine.Die Menge der frei vorliegenden Sterine ergibt sich aus der Differenz der gemeinsam bestimmten veresterten und freien Sterine und

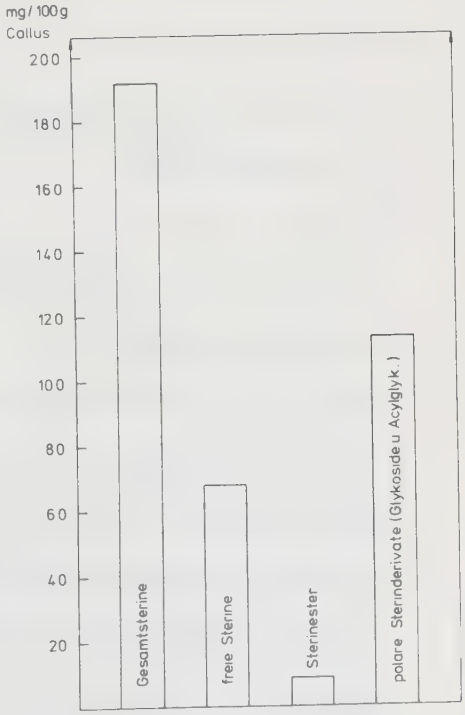


Abbildung 27 : Der Gehalt an Gesamtsterinen, freien Sterinen,Sterinestern,Sterin- und Acyl-Steringlykosiden im Callusgewebe

diesem Wert für die veresterten Sterine.
Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 27 wiedergegeben.Der Gesamtsteringehalt des Callus' A betrug 0,19 %, bezogen auf das Trockengewicht (191 mg/100 g Callus).Die Hauptmenge der Sterine liegt im Callus in Form von polaren Sterinderivaten,d.h. gebunden als Glykoside bzw. Acyl - Glykoside vor (113,5 mg/100 g Callus ≙ 59,4 % der Gesamtsterine).Die Sterinester sind nur zu 4,7 % (9 mg/100 g Callus) an den Gesamtsterinen beteiligt.35,9 % der Gesamtsterine liegen frei vor (68,5 mg/100 g Callus).

2. Dc Nachweis von Steroidsapogeninen und -alkaloiden im Callusgewebe

Die Bildung neutraler und basischer Steroidsaponine ist ein charakteristisches phytochemisches Merkmal der Solanum - Arten.Für das Kraut von S. dulcamara geben VAGUJFALVI und Mitarb. (1966) bezogen auf das Trockengewicht einen Steroidalkaloidgehalt von 0,47 % und einen Steroidsapogeningehalt von 0,18 % an.KÖTHE (unveröffentlicht) fand in den Blättern der Tomatidenol - Sippe verschiedener Herkünfte und verschiedenen Alters einen Yamogeningehalt von 0,04 - 0,68 % und in den Sprossen von 0,26 - 0,73 %.Im folgenden soll geprüft werden,ob Calluskulturen von S. dulcamara diese Fähigkeit zur Steroidalkaloid- und Steroidsapogeninbildung beibehalten.

Die Analysen wurden an dem Sprosscallus A,den selektierten Mutanten B und C sowie dem Blattcallus F der Soladulcidin - Sippe von S. dulcamara durchgeführt (s.S. 53 ff),deren Herkunftspflanze das Steroidpaar Soladulcidin/Tigogenin führt. Hierzu wurden die Calli nach der von VAGUJFALVI und Mitarb. (1971) für die Callusanalyse von Solanum laciniatum angegebenen Methode zur dc Analyse extrahiert und aufgearbeitet. Jeweils 10 g des gefriergetrockneten und gemahlenen Callusgewebes wurden mit 70 %igem Methanol heiss extrahiert und der Methanolauszug durch Ausschütteln mit Petroläther entfettet.Der Petrolätherauszug diente zur Analyse der im Callus frei vorliegenden Sterine (s.S. 63 ff).Der entfettete Methanolauszug wurde eingeengt,sauer hydrolysiert und nach Alkalisierung mit konz. Ammoniaklösung das Hydrolysat in Chloroform ausgeschüttelt.Von den erhaltenen Rückständen der Chloroform - Ausschüttelung wurden für die dc Analyse jeweils 5 %ige Lösungen hergestellt (s.Exp.Teil,S. 186). Die dc Analyse erfolgte auf Kieselgel 60 - Fertigplatten mit den Fliessmitteln Cyclohexan/Essigsäureäthylester/H_2O (60 : 40 : 0,5) und Chloroform/Methanol (95 : 5)(System VII bzw. VIII,s.S. 161).Als Vergleichssubstanzen wurden die Steroidalkaloide Soladulcidin,Solasodin und Tomatidenol, das Steroidsapogenin Tigogenin und das Sterin Cholesterin aufgetragen.Als Detektionsmittel wurden Anisaldehyd - H_2SO_4 , Vanillin - H_3PO_4 und DRAGENDORFF - Reagenz verwendet.

Abbildung 28 zeigt die mit dem Fliessmittel Cyclohexan/

Essigsäureäthylester/H_2O erfolgte Trennung.Die Extrakte der vier Calli stimmten in ihrem Komponentenspektrum vollständig überein.Bei allen traten im Chromatogramm acht Substanzen auf,die sich mit Vanillin - H_3PO_4 violett,gelblich oder blau färbten.Die im untersten Rf - Bereich sich violett färbende Komponente stimmte in Laufhöhe und Färbung mit Soladulcidin/Solasodin überein.Mit DRAGENDORFF - Reagenz färbte

Abbildung 28 : Dc Nachweis von Steroidsapogeninen und -alkaloiden im Callusgewebe von S. dulcamara

1 = Sprosscallusgewebe A
2 = Mutante B
3 = Mutante C
4 = Blattcallusgewebe F
5 = Tigogenin
6 = Solasodin
7 = Soladulcidin
8 = Cholesterin
9 = Tomatidenol

(System XII,s.Exp.Teil,S. 163)

sie sich wie diese orangegelb,so dass es sich um ein Alkaloid handeln muss.Mit Anisaldehyd - H_2SO_4 erschien diese Substanz wie Soladulcidin türkisfarben,während Solasodin auch hier eine violette Färbung ergab.

Eine weitere Komponente war nach Laufhöhe und Gelbfärbung mit Tigogenin identisch.Als Hauptkomponente erschien im DC jeweils ein mit Cholesterin übereinstimmender Fleck.Es dürfte sich bei diesem um Sterine handeln,die im Callus als Glykoside bzw. Acyl - Glykoside vorgelegen haben und durch die Hydrolyse gespalten worden sind.Auch in dem System Chloroform/Methanol liess sich die mit Soladulcidin/Solasodin übereinstimmende Substanz eindeutig nachweisen (hRf 22).

Zum direkten Vergleich der Steroidalkaloid- bzw. -sapogeninführung des Callus' mit der der intakten Pflanze wurden 7,5 g getrocknete Blätter der Pflanze,aus der die Calluskulturen gewonnen worden waren,und die dreifache Menge von Callus A (22,5 g) nach der für die Isolierung von Steroidalkaloiden und -sapogeninen üblichen Weise aufgearbeitet (KUHN u. LÖW 1947;SANDER 1961) und dc analysiert.Das gepulverte Callus- bzw. Blattgewebe wurde mit 3 %iger Essigsäure heiss ausgezogen,die basischen Steroidglykoside mit konz. Ammoniaklösung ausgefällt und die Fällung zur weiteren Reinigung mit Methanol am Rückfluss ausgekocht.Nach salzsaurer Hydrolyse der Methanolrückstände wurde das Hydrolysat auf pH 9 eingestellt und die Steroidalkaloidaglyka mit Chloroform ausgeschüttelt.Der Rückstand dieser als "Roh - Alkaloide"

bezeichneten Fraktion betrug beim Callusgewebe 13,5 mg und beim Blatt 35,5 mg,entsprechend 0,06 bzw. 0,46 % vom Trockengewicht.Zur dc Analyse wurden sie in wenig Chloroform gelöst.

Zur Gewinnung der neutralen Steroidsapogenine wurde das ammoniakalische Filtrat der Steroidalkaloidglykosid - Fällung mit n - Butanol ausgeschüttelt und der Butanol - Rückstand salzsauer hydrolysiert.Nach Neutralisation wurden die Steroidsapogenine mit Chloroform ausgeschüttelt.Der Rückstand der Chloroform - Ausschüttelung,der als "Roh - Sapogenine" bezeichnet wurde,betrug beim Callus 56,8 mg und beim Blatt 50,3 mg,entsprechend 0,25 bzw. 0,67 % vom Trockengewicht. Zur dc Analyse wurden diese Rückstände in ca. 0,5 ml Chloroform gelöst.

Abbildung 29 zeigt das im Fliessmittelsystem Chloroform/ Methanol (95 : 5) nach Detektion mit Anisaldehyd - H_2SO_4 erhaltene Komponentenspektrum der Roh - Alkaloid- und Roh - Sapogeninfraktionen des Callus- und Blattgewebes.Auch nach diesem Aufarbeitungsverfahren liess sich in den Alkaloidfraktionen des Callusgewebes und der Blätter Soladulcidin nachweisen,das sich mit Anisaldehyd - H_2SO_4 türkis anfärbte.In Spuren war das Steroidalkaloid auch noch in der Roh - Sapogeninfraktion nachweisbar.Obwohl beim Callus von der dreifachen Gewebemenge ausgegangen worden war,erwies sich der Soladulcidin - Fleck hier als bedeutend kleiner als bei der Blatt - Steroidalkaloidfraktion.Im Vergleich zum Blatt bildet der Callus somit Steroidalkaloide nur in Spuren.

In der Fraktion der Roh - Sapogenine war beim Blatt wie auch beim Callus auf der Höhe von Tigogenin ein Steroidsapogenin durch die charakteristische Gelbfärbung mit Anisaldehyd - H_2SO_4 nachweisbar.Die Fleckengrösse war hier annähernd gleich In beiden Fraktionen traten jeweils Sterine auf,deren Anteil auf Grund der Fleckengrösse im Callusgewebe grösser war als im Blatt.Auch im Fliessmittelsystem Cyclohexan/Essigester/

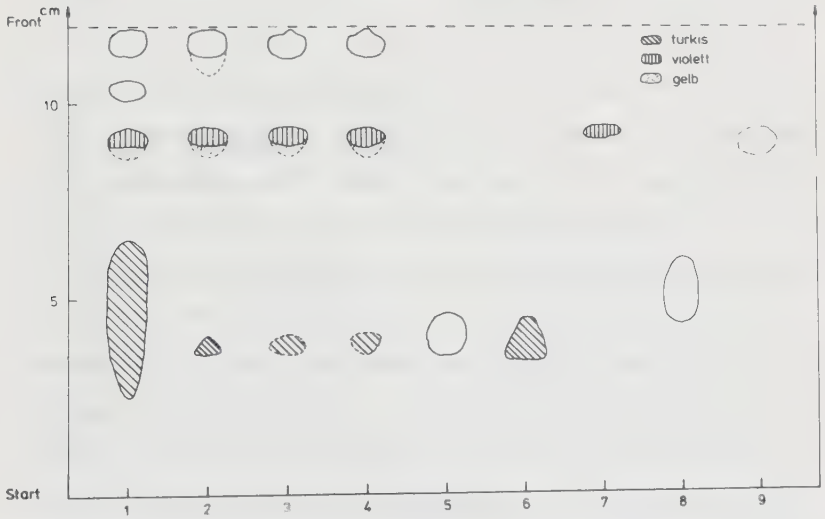


Abbildung 29 : Dc Analyse der Roh - Alkaloid- und Roh - Sapogeninfraktionen aus Callusgewebe und Blättern der Soladulcidin - Sippe von S. dulcamara

1 = Roh - Alkaloidfraktion Blätter
2 = Roh - Alkaloidfraktion Callus
3 = Roh - Sapogenine Blätter
4 = Roh - Sapogenine Callus
5 = Solasodin
6 = Soladulcidin
7 = Cholesterin
8 = Tomatidenol
9 = Tigogenin

(System XIII,s.Exp.Teil,S. 163)

H_2O (60 : 40 : 0,5) liessen sich anhand der Vergleichssubstanzen Soladulcidin und Tigogenin nachweisen.Die untersuchten Calluskulturen in S. dulcamara sind somit in der Lage,Steroidalkaloide und -sapogenine wie in der intakten Pflanze zu bilden.

3. Diskussion der Ergebnisse zur Steroidbildung der Calluskulturen von S. dulcamara

Die Bildung pharmazeutisch wichtiger Sekundärstoffe in pflanzlichen Zellkulturen bringt viele Vorteile gegenüber der Gewinnung dieser Stoffe aus der intakten Pflanze mit sich.So ist es nicht verwunderlich,dass in den letzten Jahren verstärkte Bemühungen einsetzten,die Bildung sekundärer Pflanzenstoffe in Zellkulturen zu untersuchen (GRÖTZMANN 1966; REINHARD 1967;BECKER 1969;TEUSCHER 1973;CZYGAN 1975;ZENK et al. 1977;MOSSNER u. CZYGAN 1978).Bisher sind die Ausbeuten an Sekundärstoffen in Zellkulturen im Vergleich zu denen aus intakten Pflanzen im allgemeinen sehr gering.Es gibt jedoch auch Ausnahmen.Von Morinda citrifolia (Anthrachinone)(ZENK et al. 1975),Panax ginseng (Saponine),Catharanthus roseus (Indolalkaloide) und Coleus blumei (Rosmarinsäure)(s.bei METZ 1978) konnten Zellkulturen installiert werden,die ein Mehrfaches von der in der Pflanze auftretenden Menge dieser Sekundärstoffe produzierten.Auf der anderen Seite sind eine Reihe von pharmazeutisch wichtigen Stoffen bisher in ent-

sprechenden Zellkulturen noch nicht gefunden worden.

Eine der Ursachen dafür,dass in der Regel Sekundärstoffe - wenn überhaupt - in Zellkulturen nur in sehr geringer Konzentration vorliegen,kann darin zu suchen sein,dass es sich bei den Zellen gut wachsender Kulturen um junge,den meristematischen Pflanzenteilen entsprechende Zellen handelt,die infolge des optimalen Nährstoffangebotes eine erhöhte Stoffwechselaktivität aufweisen.Es ist denkbar,dass hier die für die Synthese eines Sekundärstoffes notwendigen primären Vorstufen rascher abgebaut werden,als sie in den betreffenden Biosyntheseweg eingeschleust werden können (TEUSCHER 1973).Darüberhinaus kann heute als gesichert gelten,dass Sekundärstoffe höherer Pflanzen keine stoffwechselinaktiven Endprodukte darstellen,sondern dass Synthese und Abbau dieser Stoffe in der Zelle nebeneinander ablaufen (BARZ 1975; BARZ u. HÖSEL 1975).Der gebildete Sekundärstoff könnte so in den stoffwechselaktiven,wachsenden Calluszellen schnell wieder katabolisiert werden.Da für eine wirtschaftliche Stoffproduktion durch Zellkulturen eine bestimmte Dichte und Wachstumsgeschwindigkeit derselben vonnöten ist,sind bisher in den meisten Fällen die Nährmedien für eine zu installierende Calluskultur in dieser Richtung optimiert worden.Inzwischen hat sich jedoch gezeigt,dass für eine maximale Sekundärstoffproduktion einerseits und ein optimales Wachstum der Kulturen andererseits unterschiedliche Wuchsstoffrelationen in den Nährlösungen notwendig sein können

(CZYGAN 1975).

Weitere Gründe für die mangelnde Sekundärstoffproduktion durch pflanzliche Zellkulturen können sein,dass hier die notwendigen Enzyme nicht in ausreichendem Maße gebildet werden und/oder die in der Zellkultur vorliegenden Reaktionsbedingungen (pH - Wert,Ionenmilieu,Co - Faktoren, Hemmstoffe) die vorhandenen Enzyme nicht optimal wirksam werden lassen.Auch muss daran gedacht werden,dass die Fähigkeit zu einer erhöhten Bildung von Sekundärstoffen in Geweben eng mit der Möglichkeit zu ihrer Akkumulation verknüpft ist.Stoffe,die für die sie produzierenden Zellen selbst giftig sind,können nur dann angehäuft werden,wenn gleichzeitig entsprechende Schutzvorrichtungen wie Ölzellen und Exkretbehälter für ihre Speicherung zur Verfügung stehen. So wurden etwa ätherische Öle in Zellkulturen von Ruta graveolens (REINHARD et al. 1968;CORDUAN u. REINHARD 1972),Pimpinella anisum (BECKER 1970) und Mentha (WANG u. STABA 1963) nur dann gefunden,wenn morphologische Strukturen für die Speicherung in Form spezialisierter Zellen differenziert worden waren.Stoffe,die in der intakten Pflanze nicht in spezialisierten Idioblasten lokalisiert sind,werden daher häufiger auch von Zellkulturen gebildet.

Welche der genannten Möglichkeiten im Einzelfall für die mangelhafte Sekundärstoffproduktion in Zellkulturen verantwortlich zu machen sind,bleibt zur Zeit noch offen.

Ein wesentliches Kennzeichen pflanzlicher Sekundärstoffe

ist,dass sie aus dem Grundstoffwechsel ausgeschieden werden und als "Abfallprodukte" des Stoffwechsels keinen sofort ersichtlichen Nutzeffekt für die Pflanze haben.Macht man sich diese Definition der Sekundärstoffe zu eigen,so sind die Sterine nicht zu den üblichen Sekundärstoffen zu zählen,da sie in allen Organismen vorkommen und hier als lebenswichtige architektonische Komponenten der Biomembranen fungieren (u.a. NES 1974;GRUNWALD 1975;HARTMANN et al. 1975; MEANCE et al. 1976).Aus diesem Grunde ist ihre Bildung auch in Zellkulturen in einer Grössenordnung zu erwarten,die mit der intakten Pflanze vergleichbar ist.

Die aus Sprossen eines Klons der Soladulcidin - Sippe von S. dulcamara installierte Calluskultur führte auf das Trockengewicht bezogen 1,87 % petrolätherlösliche Lipide, die nach Hydrolyse einen unverseifbaren Anteil von 0,21 %, bezogen auf das Trockengewicht,hinterliessen.Über die Hälfte dieses Unverseifbaren wurde von Sterinen gebildet.Diese wurden als ein Gemisch aus Cholesterin,Campesterin,24 - Methylencholesterin,Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin identifiziert (Strukturformeln s.Abb. 3,S. 16).Die qualitative Sterinführung des Callus' stimmt damit mit der der petrolätherlöslichen Lipide der Blätter desselben Klons von S. dulcamara überein,die von WILLUHN u. KÖSTENS (1976) analysiert worden sind.Lediglich Brassicasterin,das in der entsprechenden Fraktion der Blätter zu 6 % enthalten ist, wird in der Calluskultur nicht gebildet.Dieses Sterin ist bisher in keiner Zellkultur gefunden worden,so dass sich

dieser Befund in das allgemeine Bild der bisherigen Kenntnisse über die Sterinbildung in pflanzlichen Zellkulturen einordnet (s. auch Kap. II,S. 15 ff).Lediglich RADWAN und Mitarb. (1975) fanden in einer von mehreren Zellkulturen von Brassica napus Spuren von Brassicasterin in einer Sterylglykolipidfraktion.

Da die Calluskultur aus Pflanzen des von WILLUHN u. KÖSTENS (1975,1976) untersuchten Klons angelegt worden war,lässt sich auch die quantitative Zusammensetzung der aus dem Callus und aus der intakten Pflanze isolierten Sterinfraktion vergleichen.In den Blättern bilden Sitosterin,Stigmasterin und Cholesterin mit 39 , 21 bzw. 21 % die Hauptkomponenten dieser Fraktion (WILLUHN u. KÖSTENS 1976).Im Callus dominieren in dieser Fraktion Sitosterin mit 54 % und Isofucosterin, das in den Blattsterinen nur zu 4 % enthalten ist,mit 21 % (s.Tab. 9,S. 90).Die Hauptkomponente Stigmasterin der Blätter wird vom Callus dagegen nur in geringem Umfange gebildet (6 % der Fraktion,s.Tab. 9,S. 90).Da die relative Zusammensetzung der Sterine der Wurzeln,Sprosse,Blätter und Früchte dieses Klons praktisch dieselbe ist und auch während der Vegetationsperiode unverändert bleibt (WILLUHN u. KÖSTENS 1975),kann in dieser auffallenden Abweichung der prozentualen Zusammensetzung der Sterinfraktion aus der installierten Zellkultur eine unterschiedliche Konzentration bzw. Aktivität der an der Biosynthese der Seitenkette beteiligten Enzyme gesehen werden.Insbesondere scheint hier der Alkylierungsmechanismus,der zu den Δ^{22} - Sterinen führt

(GOAD et al. 1974;WILLUHN 1976),in der Calluskultur nicht oder nur wenig ausgeprägt zu sein,wie aus dem Fehlen von Brassicasterin und der verhältnismässig geringen Konzentration an Stigmasterin geschlossen werden kann.
In höheren Pflanzen kommen ganz allgemein neben den mit Petroläther extrahierbaren freien Sterinen und Sterinestern als polare Derivate Steringlykoside und Acyl - Steringlykoside vor (EICHENBERGER 1977).Auch sie sind Bestandteile der Zellmembranen (s. auch GRUNWALD 1975).Die Glykosidierung der Sterine erfolgt an den Plasmamembranen,im ER und im Golgi - Apparat,in deren Membranen die Enzyme fest verankert sind (FORSEE et al. 1974;HARTMANN et al. 1975,1977; BOWLES et al. 1977;HARTMANN - BOUILLON u. BENVENISTE 1978). In S. dulcamara sind diese polaren Sterinderivate von KÖSTENS u. WILLUHN (1973) als Galaktoside bzw. als Palmitinsäureester dieser Galaktoside identifiziert worden.
In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt,dass auch Calluskulturen die Bildung von Steringlykosiden und veresterten Steringlykosiden vollziehen.Bei den Steringlykosiden handelt es sich auch hier um Galaktoside;die Säurekomponente der Acyl - Glykoside wurde als Palmitinsäure identifiziert. Hauptkomponente dieser Sterinderivate war wie bei der intakten Pflanze jeweils Sitosterin.Im Unterschied zur intakten Pflanze konnte jedoch auch bei diesen Sterinderivaten kein Brassicasterin und bei den Acyl - Steringlykosiden darüberhinaus kein Isofucosterin nachgewiesen werden (s. Tab. 9,S.90),während Stigmasterin auch hier wiederum in

vergleichsweise geringen Konzentrationen auftrat.
Während unserer Untersuchungen ist auch von RADWAN u. MANGOLD (1976) an Callus- und Suspensionskulturen anderer Pflanzenarten gezeigt worden,dass Zellkulturen die Kapazität zur Synthese von Steringlykosiden und veresterten Steringlykosiden besitzen.Vor kurzem ist von YOSHIKAWA u. FURUYA (1979) aus Zellkulturen von Digitalis lanata erstmals eine Sterin - UDPG - Glykosyltransferase isoliert worden,die hier eine zwei- bis fünffach höhere Aktivität als in der intakten Pflanze aufwies.Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Gehaltsbestimmungen,die RADWAN u. MANGOLD (1976) an Sterinderivaten in Zellkulturen durchgeführt haben.Ihre gravimetrische Bestimmung einzelner Lipidklassen nach säulenchromatographischer Auftrennung der Gesamtlipidfraktion ergab,dass sich die Lipide der heterotrophen Zellkulturen von denen grüner Pflanzenorgane durch einen relativ hohen Anteil an Sterinen und komplexen Lipiden mit Sterinanteil unterscheiden.Etwa die Hälfte der Gesamtlipide aus Zellkulturen besteht nach den Untersuchungen dieser Autoren aus Steringlykosiden und Acyl - Steringlykosiden,ein Viertel aus Sterinen und Sterinestern,und nur das restliche Viertel wird von den anderen Lipidklassen,einschliesslich Kohlenwasserstoffen,Fettsäuren und Triglyceriden,gebildet.
Wir haben in unseren Untersuchungen den Gesamtsteringehalt bezogen auf das Trockengewicht des Callusgewebes und die prozentualen Anteile der frei,verestert und in polarer Bindung vorliegenden Sterine an den Gesamtsterinen photo-

metrisch bestimmt.Mit 0,19 % erwies sich hierbei der Steringehalt des Callusgewebes als dreimal so hoch wie der der Sprosse (0,07 %) und als fast doppelt so hoch wie der der Blätter (0,10 %) der intakten Pflanze desselben Klons (WILLUHN u. KÖSTENS 1975).59,4 % der Gesamtsterine liegen im Callusgewebe als Glykoside und Acyl - Glykoside vor,35,9 % frei und 4,7 % als Ester (s.Abb. 27,S. 93).Unter Berücksichtigung des gebundenen Zuckers bzw. der Zucker- und Säurekomponente bei den Steringlykosiden bzw. Acyl - Steringlykosiden ergibt sich für das Callusgewebe von S. dulcamara zwischen den polaren Sterinderivaten (Glykoside und Acyl - Glykoside) und den freien und veresterten Sterinen gewichtsmässig ein Verhältnis von annähernd 2 : 1,wie dies auch RADWAN u. MANGOLD (1976) in Callus- und Suspensionskulturen anderer Species' auf anderem Wege gefunden haben.
Vergleicht man den prozentualen Anteil der freien Sterine und der gebundenen Sterinderivate an den Gesamtsterinen des Callusgewebes mit den entsprechenden Werten,wie sie von WILLUHN u. KÖSTENS (1975) für die Sprosse und Blätter der intakten Mutterpflanze angegeben werden,so stimmen diese weitgehend mit den für das Callusgewebe erhaltenen überein (Sprosse bzw. Blätter : freie Sterine 44,3 % bzw. 42,4 % . Sterinester 2,5 % bzw. 2 % ; polare Sterinderivate 53,2 % bzw. 55,5 %).Der prozentuale Anteil an Steringlykosiden und acylierten Steringlykosiden zeigt sich im Callusgewebe mit 6 bzw. 4 % nur geringfügig gegenüber den Organen erhöht.Der geringsten Anteil an den Gesamtsterinen haben mit 4,7 %

auch im Callusgewebe die veresterten Sterine.
Neben den Sterinen wurden in der Calluskultur von S. dulcamara die Triterpene Cycloartenol,24 - Methylencycloartanol, Cycloeucalenol und Obtusifoliol gaschromatographisch identifiziert (s.Abb. 19,S. 68;Strukturformeln Abb. 3,S. 16), die die Biosynthesevorstufen der Sterine darstellen und bereits in Zellkulturen von Nicotiana tabacum (BENVENISTE et al. 1966 b,1969;BENVENISTE 1968) und Digitalis lanata (Cycloartenol und 24 - Methylencycloartanol;REINHARD et al. 1978) nachgewiesen worden sind.

Bei den sich biogenetisch vom Cholesterin ableitenden charakteristischen Inhaltsstoffen der Solanum - Arten,den Steroidsapogeninen und Steroidalkaloiden,handelt es sich im Gegensatz zu den Sterinen um typische Sekundärstoffe. Wie in Kap. II,S. 15 ff ausgeführt wurde,ist die Bildung der pharmazeutisch wichtigen Stoffgruppe der Steroidsapogenine durch Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten bereits mehrfach nachgewiesen worden.Aus der Gattung Solanum sind zu diesen Untersuchungen bisher nur Solanum laciniatum (VAGUJFALVI et al. 1971;SUPNIEWSKA u. DOHNAL 1972) und S. xanthocarpum (HEBLE et al. 1968) herangezogen worden.In ihren Zellkulturen konnte das für diese beiden Arten typische Spirostanol Diosgenin (s.Abb. 1,S. 10) nachgewiesen werden,wobei VAGUJFALVI und Mitarb. (1971) hier annähernd den gleichen Gehalt wie in der intakten Pflanze feststellten. In der vorliegenden Arbeit wurde S. dulcamara als dritte

Solanum - Art auf die Fähigkeit zur Beibehaltung der Spirostanolbildung in Calluskulturen untersucht.Sowohl in Sprosscalli und zwei davon selektierten Mutanten als auch in Blattcalli der Soladulcidin - Sippe konnte das für diese Sippe charakteristische Spirostanol Tigogenin nachgewiesen werden.Die Metabolisierung von Cholesterin zu den Spirostanolen scheint somit allgemein auch in Zellkulturen verwirklicht zu werden.

Die Zellkulturen der genannten beiden Solanum - Arten wurden von den Autoren gleichzeitig auch auf ihre Fähigkeit zur Bildung der N - analogen Solanum - Alkaloide überprüft. Weder VAGUJFALVI und Mitarb. (1971) noch SUPNIEWSKA u. DOHNAL (1972) konnten jedoch bei S. laciniatum neben dem Spirostanol das für diese Art charakteristische Solasodin nachweisen,während HEBLE und Mitarb. (1968) andererseits in den Calluskulturen von S. xanthocarpum neben Diosgenin auch Solasodin fanden.RODDICK u. BUTCHER (1972) haben aus Wurzeln, Kotyledonen und Hypokotylen angelegte Calluskulturen von S. lycopersicon (= Lycopersicum esculentum) auf die Fähigkeit zur Bildung des Steroidalkaloides Tomatidin (s.Abb. 1,S. 10) untersucht.Sie fanden Spuren dieses Solanoles in undifferenziertem Callusgewebe lediglich in den vom Hypokotyl installierten Kulturen.Beim Übergang zur Suspensionskultur ging die Tomatidinbildung jedoch auch hier verloren.In den Sprossund Blattcalli der Soladulcidin - Sippe von S. dulcamara konnten wir in Spuren Soladulcidin nachweisen und damit in einer dritten Solanum - Art die Bildung dieser Stoffgruppe

durch Zellkulturen aufzeigen.Die bisherigen Untersuchungen zeigen somit,dass Calluskulturen grundsätzlich zur Bildung der Steroidalkaloide befähigt sind,doch scheinen die Ansprüche an das Nährmedium für ihre Synthese spezifischer zu sein als für die Biosynthese der Steroidsapogenine. Dass die Bildung von Sekundärstoffen in Gewebekulturen wie auch in der intakten Pflanze durch Art und Konzentration von Wuchsstoffen regulierbar ist,ist bekannt (TABATA et al. 1971;v.BROCKE 1972;NAGEL 1974;ALFERMANN et al. 1975;ZENK et al. 1975;DÖLLER et al. 1976;MARSHALL u. STABA 1976). HEBLE und Mitarb. (1971 a) konnten durch Substitution von 2,4 - D durch IES bzw. IBS (= β-Indolylbuttersäure) den Diosgeningehalt des Callusgewebes von S. xanthocarpum auf das Zwei- bis Dreifache steigern.Gleichzeitig verlor die Zellkultur jedoch ihre Fähigkeit zur Solasodinbildung.Die Calluskulturen von S. xanthocarpum und S. lycopersicon,in denen Steroidalkaloide nachgewiesen werden konnten,waren,wie auch die Calli von S. dulcamara,auf 2,4 - D - haltigen Medien gezogen worden,die steroidalkaloidfreien von S. laciniatum dagegen auf 2,4 - D - freien Nährmedien.Inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Zugabe von 2,4 - D zum Kulturmedium und der Bildung von Steroidalkaloiden in Gewebekulturen tatsächlich gegeben ist,müsste überprüft werden.

III. Untersuchungen zur Steroidführung des Samens von S. dulcamara

1. Fraktionierte Extraktion des Samens zum Nachweis der Sterine sowie neutraler und basischer Steroidsapogenine

Während über die Steroidführung der Wurzeln,Sprosse,Blätter, Blüten und Früchte von S. dulcamara bereits Untersuchungen vorliegen (s.Kap. I,S. 5),fehlen diese vollständig für den Samen.Es sollte deshalb geprüft werden,ob auch die Samen Steroidsapogenine und -alkaloide führen und welche Sterine in diesem Organ dominieren.Zu diesem Zweck wurden 550 g Samen der Soladulcidin - Sippe mit Petroläther erschöpfend extrahiert und aus dem entfetteten Samenpulver die Steroidglykoside mit 3 %iger Essigsäure heiss ausgezogen.Durch Alkalisieren des essigsauren Extraktes mit konz. Ammoniaklösung wurden die basischen Steroidglykoside bei 70°C ausgefällt und danach die im alkalischen Filtrat verbliebenen neutralen Steroidglykoside mit n - Butanol ausgeschüttelt.

Der Petrolätherextrakt (154,3 g ≙ 29,8 % vom Samengewicht) wurde zur Isolierung und Identifizierung der Sterine und Fettsäuren herangezogen,die ammoniakalische Fällung des Essigsäure - Auszuges (26,3 g) zum Nachweis von Steroidalkaloiden und der Butanolextrakt (17,04 g) zur Isolierung und

Identifizierung der neutralen Steroidsapogenine.

2. Dc Nachweis der neutralen Steroidsaponine und deren Aglyka

In S. dulcamara sind bisher die Spirostanole Tigogenin,Yamogenin und Diosgenin nachgewiesen worden (s.Kap. II.2,S. 94). In der Pflanze liegen sie stets glykosidisch gebunden vor. Allgemein können Spirostanole nativ sowohl als Spirostanol- als auch als Ring E - offene Furostanolglykoside auftreten (TSCHESCHE u. WULFF 1973).Durch Säurebehandlung oder auch Enzyme wird der Zucker an der Hydroxylgruppe des C-26 der Furostanolglykoside leicht abgespalten,wodurch spontan der Ringschluss zur Spiroketalgruppierung der Spirostanole erfolgt (SCHREIBER u. RIPPERGER 1966;KIYOSAWA et al. 1968; TSCHESCHE et al. 1968,1969).In welcher Form die bekannten Spirostanole in S. dulcamara nativ vorliegen,ist bisher noch nicht untersucht worden.Spirostanol- und Furostanolglykoside lassen sich dc mit EHRLICH's Reagenz differenzieren.Erstere färben sich gelb,während die Furostanolglykoside eine charakteristische Rotfärbung ergeben (KIYOSAWA et al. 1968;JOLY et al. 1969).

Zum Nachweis neutraler Steroidsaponine im Butanolextrakt wurde dieser dc im System Butanol/Äthanol/H_2O (5 : 1 : 1) aufgetrennt.Im Chromatogramm (s.Abb. 30) erschienen nach Besprühen mit EHRLICH's Reagenz vier sich rot färbende

Substanzen,bei denen es sich um Furostanolglykoside mit den hRf - Werten 47,1 , 42,1 , 37,1 und 33,5 handeln musste.Spirostanolglykoside waren nicht nachweisbar.

Zum Nachweis der Aglyka dieser Furostanolglykoside wurde

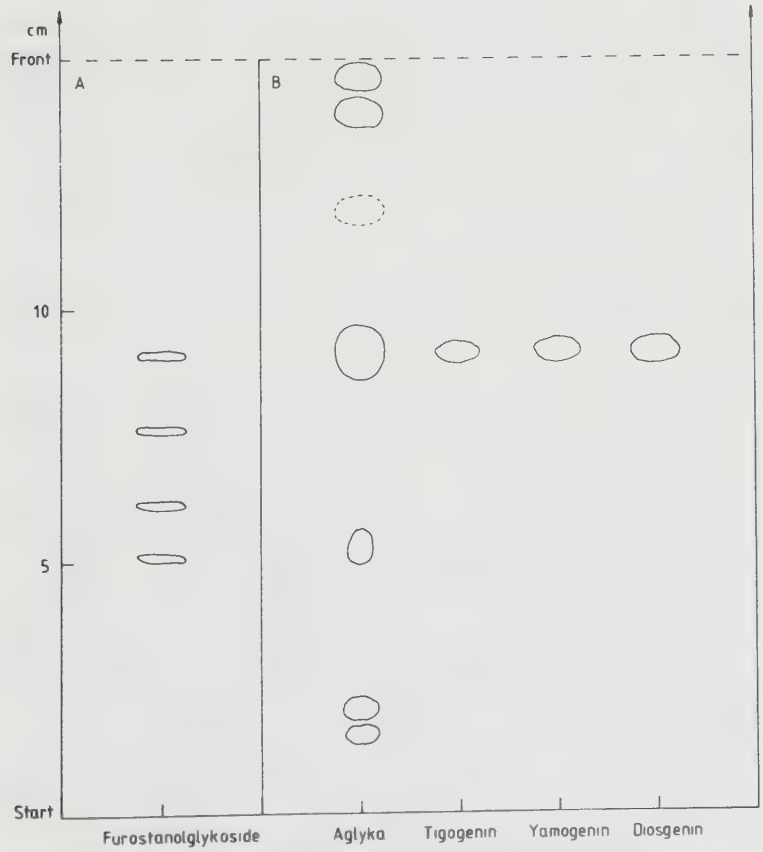


Abbildung 30 : Dc Nachweis von Furostanolglykosiden (A) und der nach Hydrolyse erhaltenen Aglyka (B) im Samen von S. dulcamara

(A : System XVII ; B : System XV ; s.Exp.Teil,S. 163)

der Butanolextrakt salzsauer hydrolysiert und aus dem neutralisierten Hydrolysat die freigesetzten Spirostanole mit Chloroform ausgeschüttelt (s.Exp.Teil,S. 171).Der Chloroformextrakt wurde auf Kieselgel - Platten mit dem Laufmittel Essigsäureäthylester/Cyclohexan (7 : 3) chromatographiert. Als Sprühreagenz diente Anisaldehyd - H_2SO_4 und Vanillin - H_3PO_4,mit denen sich Spirostanole charakteristisch gelb färben.Mitchromatographiert wurden die Spirostanole Tigogenin, Diosgenin und Yamogenin.In den Chromatogrammen erschien neben anderen Komponenten auf gleicher Höhe wie die genannten Vergleichssubstanzen ein gelber Fleck (hRf 78 - 80) (s. Abb. 30).Damit war das Vorkommen von Spirostanolen im Samen von S. dulcamara dc nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den N - analogen Spirosolanolen,bei denen sich die C-25 - isomeren Verbindungen Soladulcidin/Solasodin und Tomatidin/Tomatidenol in diesem System voneinander trennen,besitzen die c-25 - isomeren Spirostanolpaare Tigogenin/Diosgenin und Neotigogenin/Yamogenin hier dieselbe Laufhöhe.Verantwortlich für dieses unterschiedliche dc Verhalten dürfte der bei den Spirosolanolen mit der Konfigurationsänderung am C-25 gleichzeitig eintretende Konfigurationswechsel an C-22 sein (25 R,22R und 25 S;s.Abb. 1,S. 10). Die genannten vier Spirostanole dagegen besitzen alle eine 22 R - Konfiguration (25 R,22 R und 25 S,22 R).

Neben dem Hauptsapogenin mit dem hRf - Wert 78 - 80 traten im Chromatogramm in geringen Konzentrationen zwei weitere

gelbgefärbte Komponenten mit kleinerem bzw. grösserem hRf - Wert auf (22 - 29 bzw. 98).Bei der tiefer liegenden Substanz dürfte es sich auf Grund der Polarität um ein hydroxyliertes Steroidsapogenin handeln.Gitogenin (2α - Hydroxytigogenin) ist von SANDER (1961) aus Solanum sodomaeum isoliert worden. In der Komponente mit dem hRf - Wert 98 könnte ein 3,5 - Spirostadien vorliegen,das als Artefakt bei der Hydrolyse aus einem Δ^5 - ungesättigten Furostenolglykosid entsteht (PEAL 1957;BEDOUR et al. 1964;SAUVAIRE u. BACCOU 1978).

3. Isolierung und Identifizierung von Tigogenin und Diosgenin

Zur Identifizierung des dc nachgewiesenen Hauptspirostanoles der Samen wurde der Chloroformextrakt an neutralem Aluminiumoxyd gesäult (s.Exp.Teil,S. 172).Die Spirostanole wurden mit Äther und Äther/Aceton von der Säule eluiert.Die hierbei bereits kristallin anfallenden Spirostanole wurden dickschichtchromatographisch weiter gereinigt.Danach war die Fraktion dc einheitlich und stimmte in ihrem chromatographischen Verhalten mit Tigogenin,Diosgenin und Yamogenin überein.Nach Besprühen mit Anisaldehyd - H_2SO_4 und 15minütigem Erwärmen auf 110°C färbten sich die Δ^5 - ungesättigten Spirostanole Diosgenin und Yamogenin braun - gelb.Das Fleckzentrum der isolierten Substanz verfärbte sich ebenfalls nach braun - gelb,während die Peripherie wie das 5α - gesättigte Tigogenin gelb gefärbt blieb.Dies deutet darauf

hin,dass in den isolierten Kristallen neben 5α - gesättigten auch Δ^5 - ungesättigte Spirostanole vorliegen.
Eine Trennung der 5α - gesättigten Verbindungen von ihren entsprechenden Δ^5 - Dehydroverbindungen ist an mit $AgNO_3$ imprägnierten Kieselgel - Schichten möglich,wobei die Komplexbindungstendenz zwischen Silberionen und Doppelbindungen ausgenützt wird (RÖNSCH u. SCHREIBER 1967).Die Chromatographie an einer mit $AgNO_3$ - Lösung imprägnierten DC - Alufolie (s.Exp.Teil,S. 160) in dem von RÖNSCH u. SCHREIBER (1967) angegebenen Laufmittel Chloroform/Äther/Essigsäure (97 : 2,5 : 0,5) führte zur Auftrennung der isolierten Spirostanole in zwei Komponenten (Abb. 31). Die Hauptkomponente war identisch mit mitchromatographiertem 5α - gesättigtem Tigogenin (bzw. Neotigogenin),die tiefer und in bedeutend geringerer Konzentration vor-

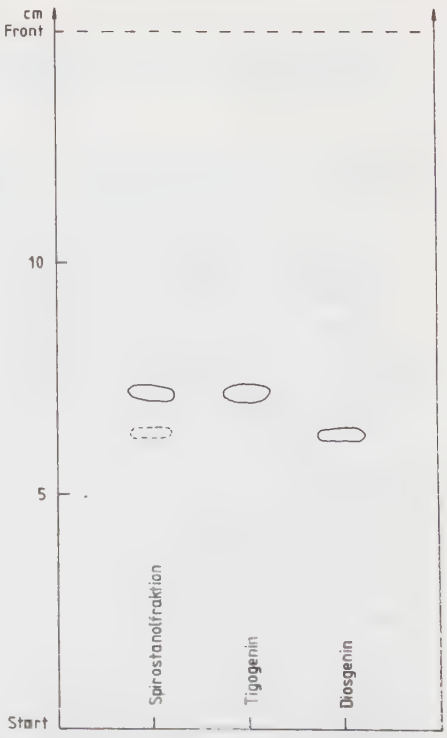


Abbildung 31 : DC der Spirostanole an $AgNO_3$ - imprägnierten Kieselgel - Schichten
(System XVIII,s.Exp.Teil, S. 164)

liegende zweite Komponente mit der entsprechenden Δ^5 - Dehydroverbindung Diosgenin (bzw. Yamogenin).

Die kristalline Spirostanolfraktion wurde in demselben System durch präparative DC in die beiden Komponenten aufgetrennt.Die so isolierte Hauptkomponente schmolz nach Umkristallisation aus Aceton bei 202 - 203°C.Der Mischschmelzpunkt mit authentischem Tigogenin zeigte keine Depression.Die spezifische Drehung in Chloroform betrug $[\alpha]_D^{20}$= - 63,3°.Die Werte stimmen mit den aus der Literatur bekannten Werten für Tigogenin überein (u.a. SANDER 1963 c : Schmp. 205 - 207°C , $[\alpha]_D^{20}$= 70,0°;RÖNSCH u. SCHREIBER : Schmp. 202 - 204°C , $[\alpha]_D^{20}$= - 69,2°).Das mit Essigsäureanhydrid/Pyridin bei Raumtemperatur hergestellte Acetylderivat schmolz bei 194°C und war im DC (System XVIII,s.Exp.Teil, S. 164) identisch mit Tigogeninacetat (SANDER 1963 c : Schmp. 201 - 204°C).

Das IR - Spektrum (Abb. 32) zeigte die für Tigogenin charak-

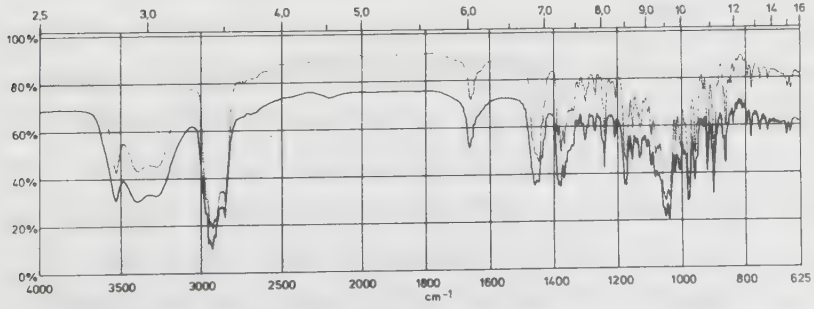


Abbildung 32 : IR - Spektrum von isoliertem (———) und authentischem (....) Tigogenin

teristischen Banden bei 866 , 900 , 923 und 985 cm^{-1},wobei die Bande bei 900 cm^{-1} stärker als die bei 923 cm^{-1} ist (WALL et al. 1952;EDDY et al. 1953).Auch in seinem weiteren Verlauf stimmt das Spektrum mit authentischem Tigogenin überein.Das sich dc nicht von Tigogenin trennende,25 S - isomere Neotigogenin unterscheidet sich im IR - Spektrum auffallend von Tigogenin.Es besitzt Banden bei 825 , 900 , 922 und 987 cm^{-1},wobei hier jedoch die Bande bei 922 cm^{-1} stärker als bei 900 cm^{-1} ist.

Das nur in einer Ausbeute von 5,3 mg erhaltene,dc mit Diosgenin übereinstimmende Spirostanol schmolz nach einmaliger Umkristallisation aus Aceton bei 206,8°C.Der Mischschmelzpunkt mit Diosgenin (Schmp. 198 - 202°C) zeigte keine Depression.Das IR - Überlagerungsspektrum stimmte mit authentischem Diosgenin überein.Auch hier lässt sich anhand des IR - Spektrums das sich chromatographisch gleich verhaltende Yamogenin ausschliessen,bei dem die Bande bei 922 cm^{-1} wiederum stärker als bei 900 cm^{-1} und die Bande bei 866 cm^{-1} nach 852 cm^{-1} verschoben ist.

Die durchgeführten Analysen lassen sich dahingehend zusammenfassen,dass die Samen der Soladulcidin - Sippe von S. dulcamara die Steroidsapogenine Tigogenin und Diosgenin führen.Hauptkomponente ist Tigogenin,d.h. das O - Analoge von Soladulcidin,das das charakteristische Steroidalkaloid in den oberirdischen vegetativen Organen dieser Sippe darstellt.Im Samen liegen sie als bisdesmosidische Furostanolsaponine vor.

4. Dc Nachweis von basischen Steroidglykosiden und deren Aglyka

4.1. Dc Nachweis basischer Steroidglykoside

Zur Prüfung auf das Vorkommen von Steroidalkaloidglykosiden im Samen wurde die nach Alkalisieren des essigsauren Extraktes erhaltene Fällung durch Auskochen mit Methanol am Rückfluss weiter gereinigt.Der Rückstand des Methanolauszuges (2,76 % ≙ 0,50 % vom Samengewicht) wurde dc in mehreren Systemen auf Steroidalkaloidglykoside untersucht.Die Detektion erfolgte mit DRAGENDORFF - Reagenz,Anisaldehyd - H_2SO_4 und Antimon(III) - chlorid.Als Vergleichssubstanzen liefen die verfügbaren,in Blättern von S. dulcamara bereits nachgewiesenen Spirosolanolglykoside Soladulcidin - tetraosid, α- und β-Solamarin (Tomatidenolglykoside),Solasonin und α-Solamargin (Solasoninglykoside) sowie Tomatin,ein Tomatidin - tetraosid aus Tomaten,mit.

In allen Trennsystemen war im Samen nur ein DRAGENDORFF - positives Steroidglykosid nachzuweisen,das mit keinem der mitchromatographierten bekannten Spirosolanolglykoside von S. dulcamara übereinstimmte.Zum direkten dc Vergleich wurden jeweils 20 g Samen von der Tomatidenol - und der Solasodin - Sippe von S. dulcamara analog aufgearbeitet.Auch in den Methanolauszügen dieser beiden Sippen liess sich jeweils nur ein Steroidalkaloidglykosid mit DRAGENDORFF - Reagenz nachweisen,das in den verwendeten fünf Laufmitteln mit dem

der Soladulcidin - Sippe übereinstimmte (s.Tab. 11 und Abb. 33 u. 34).

Tabelle 11 : Laufhöhen der basischen Steroidglykoside aus den Samen der drei chemischen Sippen von S. dulcamara,bezogen auf Solasonin (hRf 36,4 ; 21,8 ; 50 ; 54,1 ; 21,3)

Substanz	$R_{Solasonin}$ in System				
	VII	VIII	IX	X	XI
Samen DW_3 *	1,29	1,43	0,69	1,34	1,33
Samen DQ_1 *	1,29	1,43	0,69	1,34	1,33
Samen DFR *	1,29	1,43	0,69	1,34	1,33
Solasonin	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
α - Solamargin	1,56	1,69	1,54	1,29	1,38
Soladulcidin - tetraosid	1,08	0,91	1,15	1,09	1,27
Tomatin	1,12	1,37	1,37	1,38	–
α - Solamarin	1,06	1,50	0,99	1,23	1,10
β - Solamarin	1,59	2,32	1,50	2,00	1,58

* DW_3 : Soladulcidin - Sippe ; DQ_1 : Tomatidenol - Sippe ; DFR : Solasodin - Sippe

Beim Besprühen mit Anisaldehyd - H_2SO_4 färbte sich das Steroidalkaloidglykosid des Samens wie die Δ^5 - ungesättigten Tomatidenol- und Solasodinglykoside violett,während das 5α - gesättigte Soladulcidin - tetraosid und Tomatin sich blau-

grün färben.Das deutet auf das Vorliegen von Δ^5 - ungesättigten Spirosolanolen im Samen der drei chemischen Sippen von S. dulcamara hin.Die Reaktion mit CLARKE - Reagenz (Paraformaldehyd - H_3PO_4) auf Δ^6 - Doppelbindungen verlief ebenfalls positiv.

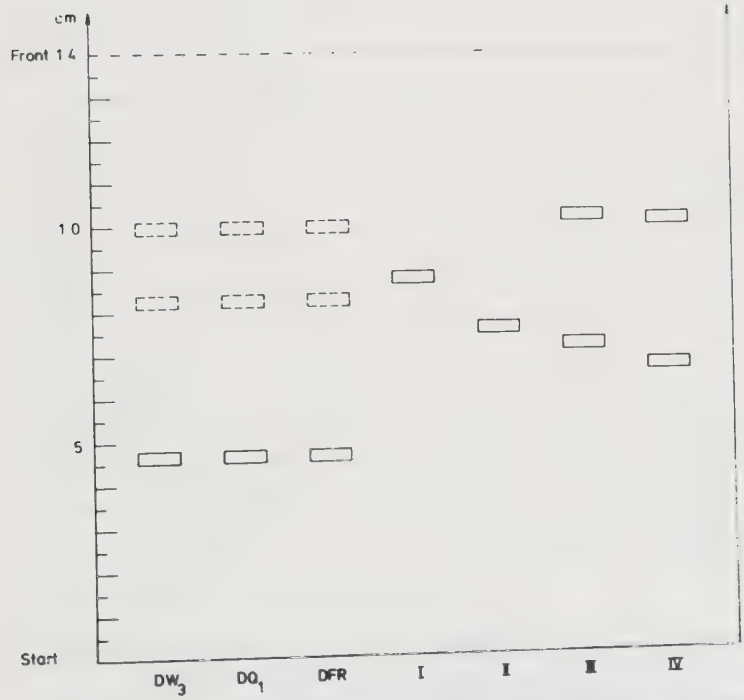


Abbildung 38 : DC der basischen Steroidglykoside aus den Samen der drei chemischen Sippen von S. dulcamara

DW_3 : Soladulcidin - Sippe
DQ_1 : Tomatidenol - Sippe
DFR : Solasodin - Sippe

I : Tomatin
II : Soladulcidin - tetraosid
III : Solasonin/α - Solamargin
IV : Solamarine

(System XI,s.Exp.Teil,S. 162)

Beim Detektieren mit Anisaldehyd - H_2SO_4 und Antimon(III) - chlorid traten darüberhinaus im Chromatogramm weitere,sich grün bzw. violett färbende Komponenten auf,bei denen es sich um stickstofffreie Steroidglykoside handeln könnte (s.Abb. 33 u. 34).

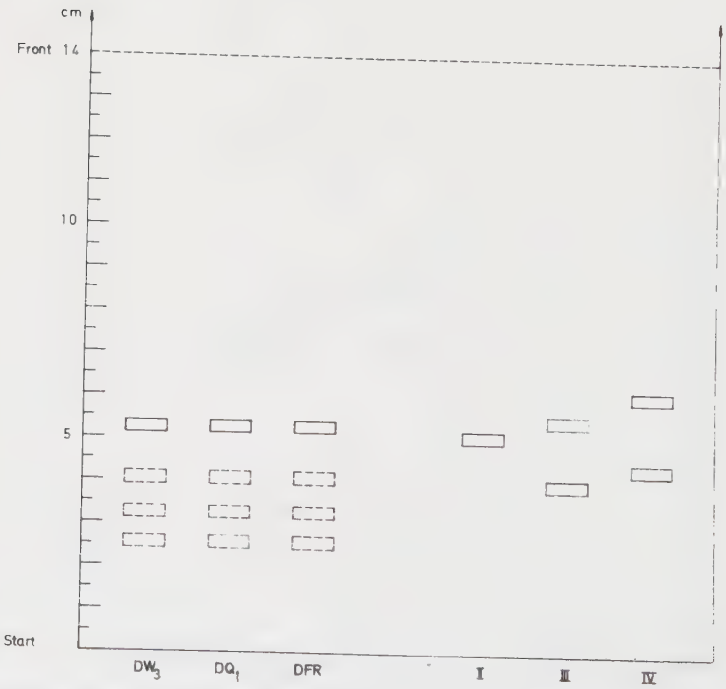


Abbildung 34 : DC der basischen Steroidglykoside aus den Samen der drei chemischen Sippen von S. dulcamara

DW_3 : Soladulcidin - Sippe
DQ_1 : Tomatidenol - Sippe
DFR : Solasodin - Sippe
II : Soladulcidin - tetraosid
III : Solasonin/α - Solamargin
IV : Solamarine

(System IX,s.Exp.Teil,S. 162)

Im Gegensatz zu den Blättern (WILLUHN 1966) lassen sich die Samen der drei chemischen Sippen von S. dulcamara auf Grund ihrer Steroidalkaloidführung dc nicht differenzieren.

4.2. Dc Nachweis der Aglyka Soladulcidin und Solasodin

Zur Identifizierung der basischen Steroidaglyka wurden 38 mg der Steroidalkaloidglykosidfraktion in methanolischer Salzsäure hydrolysiert und die erhaltenen Aglyka (3,4 mg) in den Systemen Cyclohexan/Methanol (9 : 1) dc aufgetrennt. Als Referenzen liefen jeweils die Spirosolanole Soladulcidin,Solasodin,Tomatidenol und Tomatidin mit.In den Chromatogrammen (s.Abb. 35) erschien neben anderen,nicht zuzuordnenden Komponenten auf der Höhe von Soladulcidin/Solasodin jeweils ein Fleck,bei dem es sich auf Grund seiner Färbung mit Anisaldehyd - H_2SO_4 um ein Gemisch aus Solasodin und Soladulcidin handeln konnte.Die Δ^5 - ungesättigte Verbindung Solasodin (s.Abb. 1,S. 10) färbt sich mit diesem Reagenz violett und erscheint beim Erhitzen auf 110°C früher als das 5α - gesättigte Soladulcidin,das sich blaugrün färbt. Die in der isolierten Aglyka - Fraktion an dieser Stelle auftretende Komponente färbte sich zunächst violett und ging dann in eine Mischfarbe über,die auf die gleichzeitige Anwesenheit von Soladulcidin hindeutete.Mit DRAGENDORFF - Reagenz färbte sich die Komponente wie die Vergleichssubstanzen orangegelb.

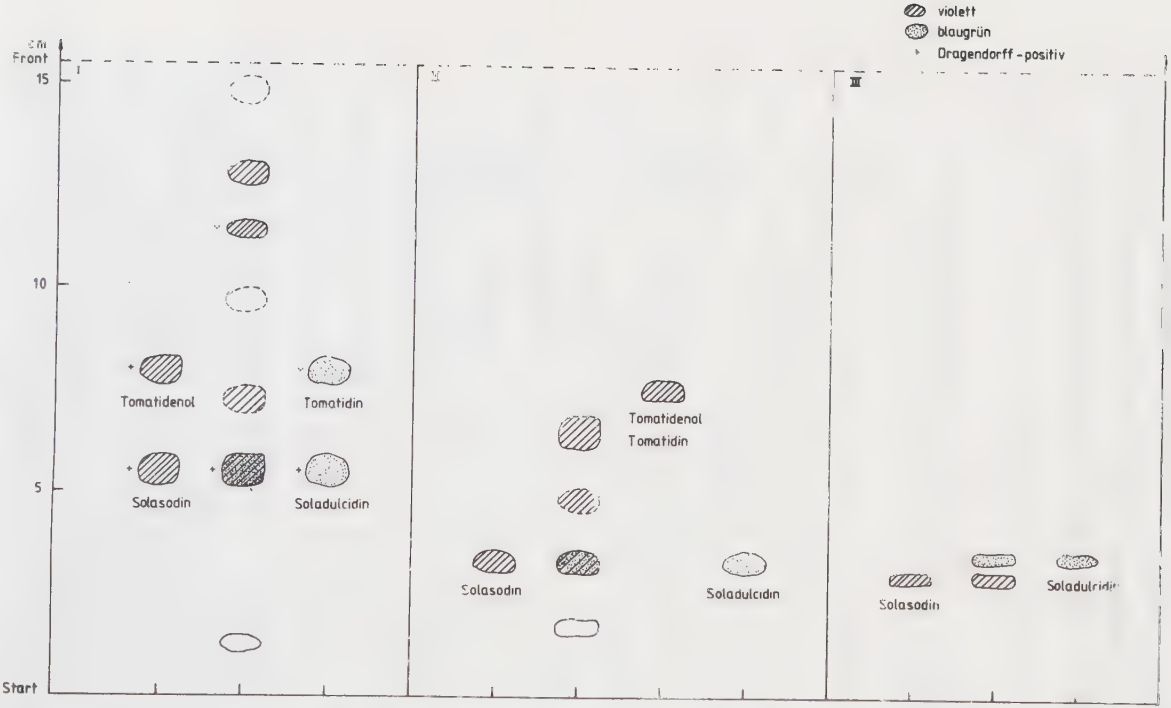


Abbildung 35 : DC der nach Hydrolyse aus der Fraktion der basischen Glykoside gewonnenen Aglyka

I : Laufmittel : Cyclohexan/Essigsäureäthylester (3 : 7) ; II : Laufmittel : Chloroform/Methanol (9 : 1) ; III : $AgNO_3$ - imprägnierte Kieselgelschicht, Laufmittel : Chloroform/Methanol (95 : 5); Detektion jeweils mit Anisaldehyd - H_2SO_4

Das Spirosolanolpaar Soladulcidin/Solasodin lässt sich dc an silbernitrathaltigen Kieselgelschichten auftrennen (RÖNSCH u. SCHREIBER 1966,1967).Zum sicheren Nachweis dieser beiden Verbindungen wurde diese Zone durch präparative Schichtchromatographie über zwei DC - Kieselgel - Alufolien im System Chloroform/Methanol (9 : 1) von den übrigen Komponenten der Aglykafraktion abgetrennt und an silbernitrathaltigen Kieselgelschichten im System Chloroform/Methanol (95 : 5) chromatographiert.Hier erschienen zwei Flecken, die nach Laufhöhe und Färbung mit Anisaldehyd - H_2SO_4 mit Soladulcidin (blaugrün) und Solasodin (violett) identisch waren.

Auf Grund der durchgeführten dc Analysen führen die Samen der Soladulcidin - Sippe von S. dulcamara die Steroidalkaloide Soladulcidin und Solasodin,bei denen es sich um die sauerstoff - analogen Verbindungen der im Abschnitt III.3. identifizierten Spirostanole Tigogenin bzw. Diosgenin handelt (s.Abb. 1,S. 10).Zur Identifizierung der anderen im Chromatogramm erscheinenden Komponenten wurden keine weiteren Untersuchungen angestellt.

5. Gc Analyse der Triterpene und Sterine des Samens

Zur Identifizierung der lipophilen Triterpene und Sterine des Samens wurde vom Petrolätherextrakt ausgegangen.Hierzu wurden zunächst 100 g Petrolätherextrakt nach Abtrennung der

frei vorliegenden Fettsäuren durch Ausschütteln mit Sodalösung (Ausbeute 8,5 g,Identifizierung s.Kap. IV,S. 138) mit methanolischer Kalilauge hydrolysiert und aus dem Hydrolysat der unverseifbare Anteil gewonnen (Ausbeute 1,8 g ≙=0,5 % vom Samengewicht,s.Exp.Teil,S. 188).Die dc Auftrennung des Petrolätherextraktes und seines unverseifbaren Anteiles in System I ergab anhand von mitgelaufenen Vergleichssubstanzen und dem Farbverhalten gegenüber LIEBERMANN - BURCHARD - Reagenz sowie Molybdato - H_3PO_4,dass die Triterpene im Samen vorwiegend als Ester vorliegen (s.Abb.36).Die im Chromatogramm des Petrolätherextraktes auf der Höhe der Sterin- und Triterpenester liegende Komponente ist im Chromatogramm des Unverseifbaren verschwunden,während hier gleichzeitig die Fleckgrösse der freien Triterpene und Sterine zunimmt.Zusätzlich erscheinen im Unverseifbaren unterhalb der freien Sterine weitere LIEBERMANN - BURCHARD - positive Substanzen,die ebenfalls als Ester im Samen vorliegen müssen.

5.1. Identifizierung der Sterine

Zur Identifizierung der frei und verestert vorliegenden Sterine wurden 40 g Petrolätherextrakt säulenchromatographisch an Kieselgel aufgetrennt und hierbei eine Esterfraktion (33,1 g) und eine Fraktion,die die frei vorliegenden Sterine führte (0,5 g) erhalten.Die abgetrennte Esterfraktion wurde

anschliessend alkalisch verseift.Im unverseifbaren Anteil (0,77 g) lagen danach die im Samen verestert auftretenden Sterine frei vor.Aus dieser Fraktion wurden die Sterine für

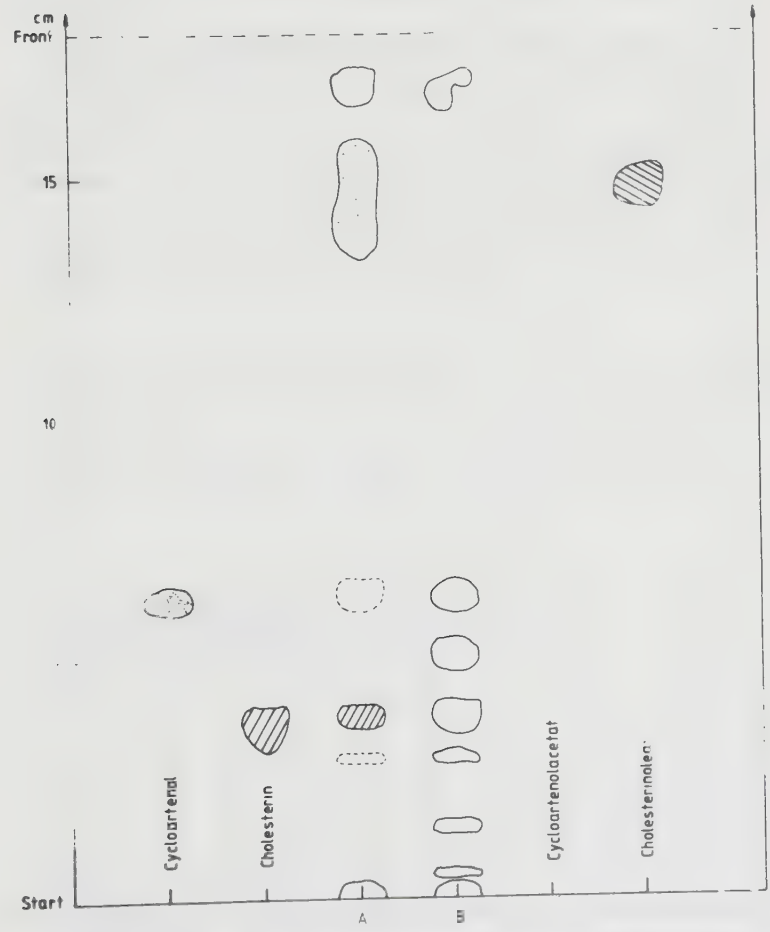


Abbildung 36 : DC des Petrolätherextraktes (A) aus dem Samen und seines unverseifbaren Anteiles (B) (System I,s.Exp.Teil,S. 159)

die gc Analyse durch präparative Dickschichtchromatographie soliert.In gleicher Weise wurde die Fraktion der im Samen frei vorliegenden Sterine sowie die im unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes anfallenden frei und verestert vorliegenden Sterine dickschichtchromatographisch gereinigt. Vor der gc Analyse wurden diese Sterinfraktionen nochmals über Kieselgel - Alufolien gereinigt.Die so erhaltenen drei Sterinfraktionen aus dem Samen wurden dann wie bei den entsprechenden Verbindungen aus dem Callusgewebe bereits beschrieben,gc als freie Sterine und nach ihrer Acetylierung

Tabelle 12 : Relative Retentionszeiten (RRT) der aus dem Samen isolierten Sterine und ihrer Acetate,bezogen auf Cholesterin bzw. Cholesterinacetat
(RT der Bezugssubstanz Cholesterin bzw. Cholesterinacetat : SE 30 : 12,6 bzw. 16,8 Min. ; OV 17 : 21,2 bzw. 23,8 Min.)

Sterine	SE 30		OV 17	
	Alkohol	Acetat	Alkohol	Acetat
Cholesterin	1,00	1,00	1,00	1,00
Campesterin	1,27	1,27	1,30	1,29
24 - Methylen-cholesterin	1,27	1,27	1,34	1,28
Stigmasterin	1,36	1,36	1,38	1,39
Sitosterin	1,59	1,57	1,65	1,60
Isofucosterin	1,59	1,57	1,81	1,73

als Acetate auf einer SE 30 - Säule und einer OV 17 - Säule aufgetrennt.Die qualitative Zusammensetzung der Fraktionen wurde durch Zuspritzen der Vergleichssubstanzen ermittelt. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Nach den durchgeführten Analysen führen die Samen der Soladulcidin - Sippe von S. dulcamara die Sterine Cholesterin Campesterin,24 - Methylencholesterin,Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin sowohl in freier als auch in veresterter Form (Strukturformeln s.Abb. 3,S. 16).Abbildung 37 zeigt hier als Beispiel der gc Trennung das an der SE 30 - Säule

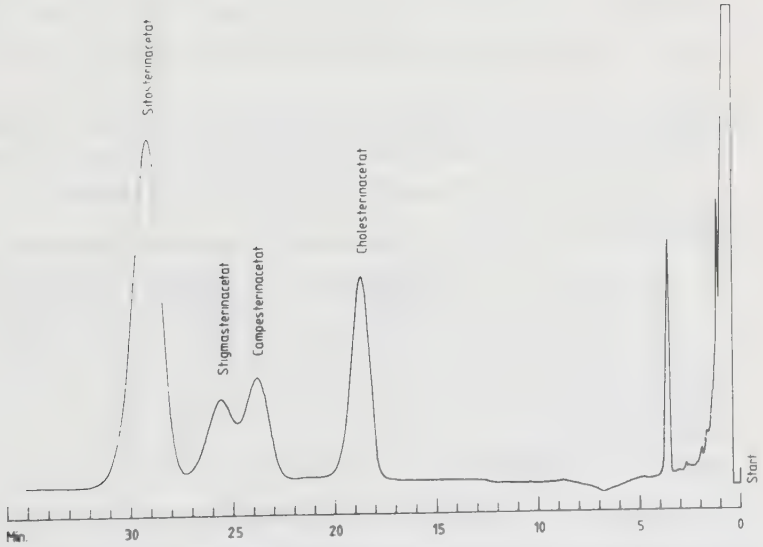


Abbildung 37 : GC der acetylierten Sterine aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes des Samens von S. dulcamara
(Säule : Silikongummi SE 30,System ;,s.Exp.Teil,S. 167)

erhaltene Fraktogramm der aus dem Unverseifbaren des Petrolätherextraktes isolierten Sterinfraktion nach ihrer Acetylierung (Fraktogramm der Sterine an der OV 17 - Säule s. bei den Callus - Sterinen,Abb. 21,S. 73).Die prozentuale Zusammensetzung der drei isolierten Sterinfraktionen ist in Tabelle 13 wiedergegeben.Von den bei der gc Analyse als kritisches Paar auftretenden Sterinen Campesterin/24 - Methylencholesterin,deren Anteil gemeinsam erfasst wurde,bildet Campesterin die Hauptkomponente,da die relative Retentionszeit des peaks an der OV 17 - Säule der des Campesterins entsprach und 24 - Methylencholesterin nur in kleineren Konzentrationen im abfallenden Gipfel auftritt (rel. Retentionszeiten s.Tab. 8,S. 74).Die gleichzeitige Anwesenheit von 24 - Methylencholesterin wurde auch im Samen darüber-

Tabelle 13 : Prozentuale Zusammensetzung der aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes isolierten Sterinfraktion sowie der frei und verestert vorliegenden Sterine des Samens

Sterine	unverseifbarer Anteil (%)	freie Sterine (%)	veresterte Sterine (%)
Cholesterin	20	9	29
Campesterin/24 - Methylencholesterin	14	12	11
Stigmasterin	12	10	14
Sitosterin	54	62	45
Isofucosterin	<1	7	1

hinaus durch dc Analyse der acetylierten Sterine an silbernitrathaltigen Kieselgel - Schichten (System IV) sichergestellt (vgl.Abb. 20,S. 72).

5.2. Identifizierung der Triterpene

Die Identifizierung der im Samen auftretenden Triterpene erfolgte aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes,der wie in Abschnitt 5,S. 125 beschrieben gewonnen wurde (1,8 g ≙ 0,5 % vom Samengewicht).Bei dieser Analyse wurden die frei und verestert vorliegenden Triterpene gemeinsam erfasst.Die Triterpenfraktion wurde durch Dickschichtchromatographie in System I aus dem Unverseifbaren isoliert.Die Zone der Triterpene ergab 0,38 g und lag in einer wachsig - öligen Form vor,die auf eine Verunreinigung mit aliphatischen Alkoholen hindeutete.
Aliphatische Alkohole sind,wie auch eine Reihe weiterer aliphatischer Verbindungen,in der Lage,mit Harnstoff kristalline Additionsverbindungen zu bilden,wozu zyklische Verbindungen nicht fähig sind (s.SCHLENK 1949).Die Triterpenfraktion wurde deshalb über eine Harnstoffaddukt - Bildung von den aliphatischen Alkoholen befreit (s.Exp.Teil,S. 177) und anschliessend noch einmal über Kieselgel - Alufolien schichtchromatographisch weiter gereinigt.Die so erhaltene Triterpenfraktion wurde anschliessend wie bei den entsprechenden Verbindungen aus dem Callusgewebe bereits beschrieben,gc als

freie Alkohole und nach ihrer Acetylierung als Acetate auf einer SE 30 - Säule und einer OV 17 - Säule aufgetrennt. Abbildung 38 zeigt als Beispiel das Fraktogramm der acetylierten Triterpenalkohole an der OV 17 - Säule.Die qualitative Zusammensetzung der Fraktion wurde durch Zuspritzen der Vergleichssubstanzen ermittelt (relative Retentionszeiten s.Tab. 14).Danach handelt es sich bei den Triterpenen des Samens um Cycloartenol (63 %),24 - Methylencycloartanol (5 %),Cycloeucalenol (30 %) und Obtusifoliol (2 %) (Strukturformeln s.Abb. 3,S. 16).Die Hauptkomponenten bilden Cycloartenol und Cycloeucalenol.

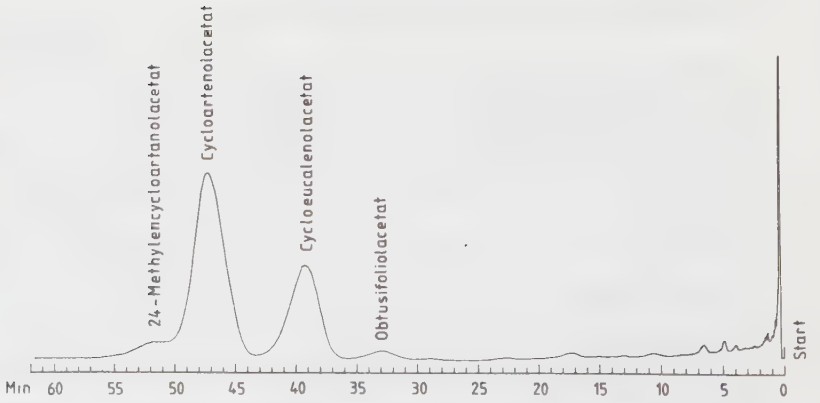


Abbildung 38 : GC der acetylierten Triterpenalkohole aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes des Samens (Säule : Silikonöl OV 17,System II,s.Exp.Teil,S. 167)

Tabelle 1: Relative Retentionszeiten (RRT) der aus dem Samen isolierten Triterpene
(RT der Bezugssubstanz Cholesterin bzw. Cholesterinacetat SE 30 : 12,6 bzw. 16,7 Min. ; OV 17 : 21,2 bzw. 23,8 Min.

Triterpene	SE 30		OV 17	
	Alkohol	Acetat	Alkohol	Acetat
Obtusifoliol	1,44	1,60	1,41	1,37
Cycloeucalenol	1,64	1,76	1,65	1,63
Cycloartenol	1,81	1,76	1,99	1,97
24 - Methylen-cycloartanol	2,00	2,10	2,19	2,15

6. Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse zur Steroidführung des Samens von S. dulcamara

Die untersuchten Samen von S. dulcamara stammten von dem Klon DW_3 der Soladulcidin - Sippe, deren Steroidführung einzelner Organe bereits untersucht worden ist (SANDER u. WILLUHN 1961; WILLUHN 1966; WILLUHN u. KÖSTENS 1975, 1976). In dem bisher noch nicht analysierten Samen konnten die Spirostanole Tigogenin und Diosgenin sowie die konfigurativ entsprechenden Spirosolanole Soladulcidin und Solasodin nachgewiesen werden (Strukturformeln s. Abb. 1, S. 10). Die Spiro-

stanole liegen im Samen nativ als Furostanolglykoside vor; nach Untersuchungen von KÖTHE (unveröffentlicht) trifft dies auch für die Blätter zu.Bei den basischen Steroiden konnte nur ein Glykosid nachgewiesen werden,das nicht mit dem in den Blättern vorkommenden Soladulcidin - tetraosid und auch nicht mit anderen bekannten Spirosolanolglykosiden identisch ist (s.Abb. 34 u. 35,S. 122 u. 124).Die Samen unterscheiden sich somit in ihrer neutralen und basischen Steroidsapogeninführung von den vegetativen oberirdischen Organen der Pflanze dieser Sippe,in denen nur Tigogenin und Soladulcidin gebildet wird (SANDER u. WILLUHN 1961; WILLUHN 1966,1967;vgl. auch SCHREIBER u. RÖNSCH 1963, 1965;SANDER 1963 a,b).Die Samen ähneln in ihrer Steroidführung dagegen den unreifen Früchten,die neben dem für die oberirdischen vegetativen Organe charakteristischen Soladulcidin zusätzlich ebenfalls Solasodin führen (SANDER u. WILLUHN 1961;WILLUHN 1966,1967;s. auch Abb. 2,S. 12).

Das Vorkommen von Spirostanolen in Samen ist u.a. auch von Digitalis purpurea (STEINEGGER u. HÄNSEL 1972) und Trigonella foenum - graecum (u.a. DAVIDAR et al. 1973) bekannt. SATO u. SAKAMURA (1973) haben in Tomatensamen Neotigogenin nachgewiesen.

Das gleichzeitige Vorkommen von Spirosolanolen in Solanum - Samen,wie hier für S. dulcamara gezeigt,scheint jedoch nicht für alle Solanum - Arten zuzutreffen.SANDER (1961) konnte in ruhenden Tomatensamen kein Tomatin nachweisen.

Es wäre hier jedoch zu überprüfen,ob andere Glykoside des Tomatidins vorliegen,wie dies von uns im Bittersüss - Samen beobachtet wurde.

Die ebenfalls erstmals in Samen von S. dulcamara identifizierten Triterpene Cycloartenol,24 - Methylencycloartanol,Cycloeucalenol und Obtusifoliol (Strukturformeln s.Abb. 3,S. 16) sind von WILLUHN u. KÖSTENS (1974) in den Blättern von S. dulcamara nachgewiesen und in der vorliegenden Arbeit auch im Callusgewebe gefunden worden.Von ITOH und Mitarb. (1977 a,1978) wurden sie auch in Samen von S. melongena und S. lycopersicon (= Lycopersicum esculentum) identifiziert.Die Autoren fanden hier und im Samen anderer Solanaceen - Arten daneben in Spuren eine Reihe weiterer Triterpene,unter denen sich auch Lanosterin und weitere C_{30} - Triterpene mit geöffnetem Cyclopropanring befanden.Das gleichzeitige Auftreten dieser Verbindungen mit grösseren Mengen der korrespondierenden 9β, 19 - Cyclopropyl - Isomeren wie Cycloartenol und 24 - Methylencycloartanol (Strukturformeln s.Abb. 3,S. 16) deutet darauf hin,dass in Solanaceen - Samen die enzymatische Öffnung des Cyclopropanringes bereits auf der Stufe der 4,4 - Dimethyl - Verbindungen erfolgen kann.Dies wäre eine Variante des allgemeinen Biosyntheseweges der Sterine in höheren Pflanzen,bei dem der Cyclopropanring des primären Squalen - Zyklisierungsproduktes Cycloartenol erst nach Abspaltung der 4β - Methylgruppe,d.h. bei Cycloeucalenol (Strukturformel s. Abb. 3,S. 16) erfolgen kann (HEINTZ u. BENVENISTE 1974;s. auch WILLUHN 1976).Der Samen von S. dulcamara wurde auf das

Vorkommen dieser in geringen Konzentrationen auftretenden Triterpene nicht geprüft.

Mit Cholesterin,Campesterin,24 - Methylencholesterin,Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin wurden im Samen die gleichen Sterine wie in den Blättern desselben Klons von S. dulcamara gefunden.Auffällig ist,dass das in den vegetativen Organen von S. dulcamara zu 4 - 12 % in der Sterinfraktion auftretende Brassicasterin (WILLUHN u. KÖSTENS 1975) vom Samen nicht gebildet wird.Dieses Fehlen von Brassicasterin im Samen ist auch bei anderen Pflanzenarten beobachtet worden,so von ITOH und Mitarb. (1977 b) bei S. melongena,S. lycopersicon und 11 weiteren Solanaceen - Arten,von PURI u. BHATNAGAR (1976) bei S. platanifolium,von COWLEY u. EVANS (1970) bei Digitalis purpurea und von STOHS und Mitarb. (1975 a) sowie SHEWRY u. STOBART (1974) bei Yucca glauca bzw. Corylus avellana.Unseres Wissens konnte Brassicasterin bisher nur in Samen von Brassica napus nachgewiesen werden (HOMBERG 1976).

Die photosynthetisch inaktiven S. dulcamara - Samen gleichen in ihrer Sterinführung dagegen vollständig den heterotroph wachsenden Calluskulturen von S. dulcamara,in denen ebenfalls kein Brassicasterin gebildet wird.Das Fehlen von Brassicasterin ist nach den bisher vorliegenden Untersuchungen ein allgemeiner Befund auch für Calluskulturen anderer Pflanzenarten (s.S. 104 f).In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Brassica napus,in deren Samen als bislang einziger Art Brassicasterin nachgewiesen wurde,auch die einzige Art ist,

in deren Zellkulturen Brassicasterin gefunden wurde (RADWAN et al. 1975).Es scheint so,dass die qualitative Sterinführung der heterotrophen Calluskulturen allgemein der der photosynthetisch inaktiven Samen und nicht derjenigen der grünen Pflanzenorgane entspricht.Damit liegen hier dieselben Verhältnisse vor,wie sie RADWAN (1975) für die einzelnen Lipidklassen in Zellkulturen,photosynthetisch inaktiven Pflanzen und Pflanzenorganen und grünen Teilen der höheren Pflanzen beschrieben hat.

IV. Die Fettsäuren in Samen und Callusgewebe

Die Fettsäuren des Samens

Die stärkefreien Samen von Solanaceen führen nach den bisher vorliegenden Untersuchungen als Hauptreservestoffe 14 - 40 % fettes Öl,in dem als Hauptfettsäure Linolsäure auftritt (HEGNAUER 1972).Das fette Samenöl von S. dulcamara ist bislang noch nicht untersucht worden.Wie in Abschnitt III.5., S. 125 f beschrieben,lässt sich aus dem Bittersüss - Samen mit Petroläther ein fettes Öl in Ausbeuten von 28 % extrahieren.Im folgenden sollen die in diesem Öl frei und gebunden vorliegenden Fettsäuren identifiziert werden.

Aus 100 g fettem Samenöl wurden die frei vorliegenden Fettsäuren durch Ausschütteln einer petrolätherischen Lösung des Öles mit einer 10 %igen wässrigen Na_2CO_3 - Lösung gewonnen (7,8 g ≙ 2,2 % vom Samengewicht).Zur Isolierung der gebunden vorliegenden Fettsäuren wurde anschliessend das von den freien Fettsäuren befreite fette Öl äthanolisch verseift.Nach Abtrennen der neutralen Bestandteile aus dem Hydrolysat durch Ausschütteln mit Petroläther wurden die Fettsäuren durch Ansäuern mit Salzsäure in Freiheit gesetzt und durch Ausschütteln mit Petroläther dem Verseifungsansatz entzogen.

Zur ersten Orientierung wurden die beiden Fettsäurefraktionen

auf Kieselgel 60 - Platten in dem System Chloroform/Essigsäureäthylester/Ameisensäure (90 · 10 : 2) chromatographiert.In diesem System lassen sich gesättigte und ungesättigte n - Fettsäuren,die hier denselben Rf - Wert aufweisen,von möglicherweise vorhandenen Oxo-,Hydroxy- und Epoxyfettsäuren abtrennen (REHM 1967;s.Exp.Teil,S. 164,System XIX).Auf Referenzbahnen liefen Palmitin- und Ölsäure mit.
Zum Nachweis wurde der Fluoreszenzindikator Pyranin (3 - Hydroxy - pyren - 5,8,10 - trisulfonsaures Natrium,Fa. Bayer Leverkusen) verwendet (REHM 1967).Dieser ergibt,als 0,015 %ige wässrige Lösung auf die Platten aufgesprüht oder in gleicher Konzentration (15 mg/100 ml H_2O) in das zum Anrühren des Kieselgels verwendete Wasser gegeben,im UV - Licht (360 nm) eine hellblaue Fluoreszenz der Fettsäuren auf gelblich - grünem Grund.
Im Chromatogramm erschien nur eine blau fluoreszierende Zone,die auf der Höhe der beiden Vergleichssubstanzen lag (Abb. 39).Danach war die Anwesenheit von höher oxydierten Fettsäuren auszuschliessen.
Für die weitere Analyse der isolierten Fettsäuren wurden diese mit Diazomethan in ihre Methylester überführt (s.Exp. Teil,S. 168).
Auch diese zeigten in dem Laufmittelgemisch Pentan/Äther (9 : 1 ;in Anlehnung an REHM 1967;System XX,s.Exp.Teil S. 165) an pyraninbesprühten Kieselgel 60 - Platten nur einen hellblau fluoreszierenden Fleck,der mit den als Referenzen mitgelaufenen gesättigten und ungesättigten Fettsäure-

methylestern auf einer Höhe lag (Abb. [illegible] nigungen erschienen auf der Platte daneben im [illegible] dunkel erscheinende Komponenten. Vor der gc Identifizierung der Fettsäuremethylester wurden diese durch präparati [illegible] Dünnschichtchromatographie in diesem System von den im UV - Licht dunkel erscheinenden Verunreinigungen befreit (s. Ex. Teil S. 158).

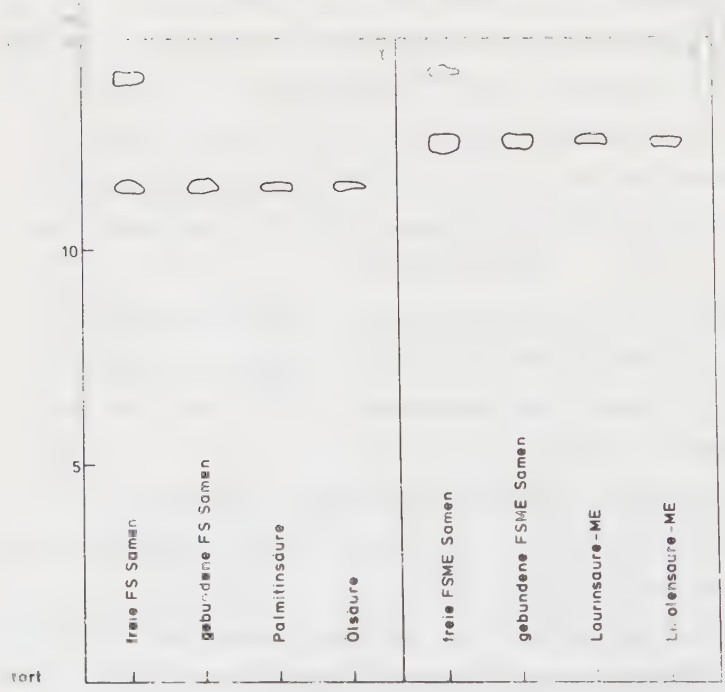


Abbildung 39 : DC der freien und der gebunden vorliegende Fettsäuren des Samens und ihrer Methylester
(I : System XIX : $CHCl_3$/Essigsäureäthylester/Ameisensäure 90 : 10 : 2 ; II : System XX : Pentan/Äther 9 : 1)

Die gc Analyse der gereinigten Fettsäuremethylester erfolgte an einem Paar Diäthylenglycolsuccinat - Säulen im Kompensationsbetrieb (System III,S. 167).Abbildung 40 und 41 zeigen die Gaschromatogramme der Methylester der freien bzw. der gebunden vorliegenden Fettsäuren des Samens.Durch Zuspritzen der Vergleichsubstanzen konnten bereits hier die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure,Margarinsäure und Ste-

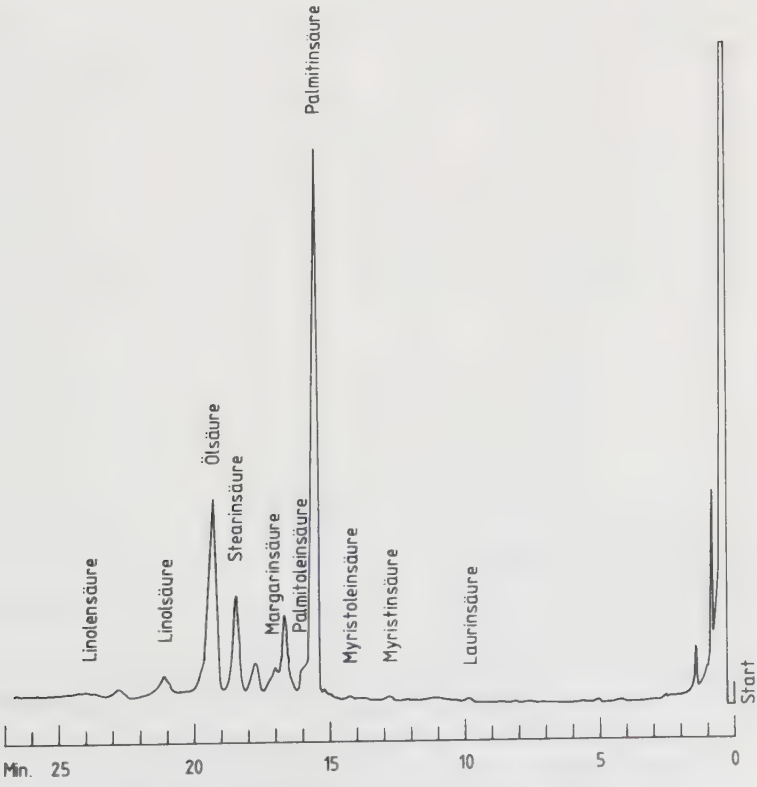


Abbildung 40 : GC der methylierten freien Fettsäuren (Säule : Diäthylenglycolsuccinat,System III,s.Exp.Teil,S. 167)

arinsäure sowie in Spuren Laurin- und Myristinsäure,die einfach ungesättigten Fettsäuren Palmitoleinsäure und Ölsäure, die zweifach ungesättigte Linolsäure sowie die dreifach ungesättigte Linolensäure nachgewiesen werden.
Da in diesem gc System bei den gesättigten und ungesättigten Fettsäuremethylestern kritische Paare auftreten können,ist es für eine gc Analyse besser,diese zunächst voneinander zu

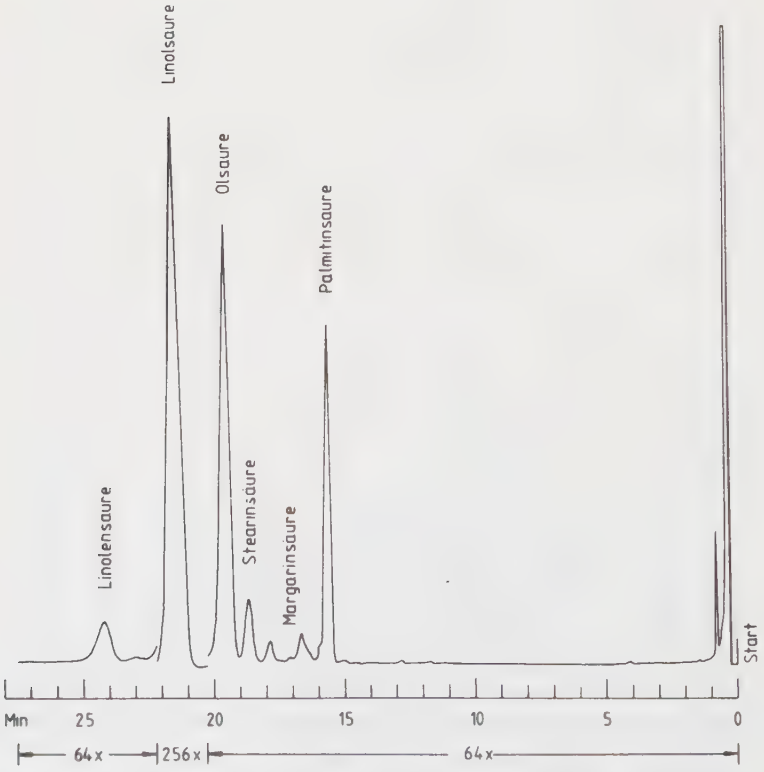


Abbildung 41 : GC der methylierten gebundenen Fettsäuren (Säule : Diäthylenglycolsuccinat,System III,s.Exp.Teil,S. 167)

trennen.Eine solche Trennung ist dc über die Quecksilber(II) -acetat - Addukte der ungesättigten Fettsäuremethylester möglich (JANTZEN u. ANDREAS 1959),die sich von den dabei nicht reagierenden gesättigten Fettsäuremethylestern mit dem Laufmittel Petroläther/Äther (4 : 1) abtrennen lassen (MANGOLD u. KAMMERECK 1961;System XXI,S. 165).Darüberhinaus ist eine dc Auftrennung der Quecksilber(II) - acetat - Addukte nach Anzahl ihrer Doppelbindungen im Laufmittel n - Propanol/Eisessig (100 : 1) möglich (MANGOLD u. KAMMERECK 1961;System XXII,S. 165).

Zur Absicherung des aus der gc Analyse der methylierten freien und gebundenen Gesamtfettsäuren erhaltenen Ergebnisses wurden diese deshalb auf dem angegebenen Wege in eine Fraktion der gesättigten und ungesättigten Fettsäuremethylester dc präparativ aufgetrennt und letztere danach weiter nach Zahl ihrer Doppelbindungen fraktioniert.Abbildung 42 zeigt die hierbei erhaltenen Trennungen.In System XXI bleiben die Addukte der ungesättigten Fettsäuremethylester am Startpunkt liegen,während die gesättigten Fettsäuremethylester praktisch mit der Lösungsmittelfront wandern.Nach Abdunsten des Lösungsmittels an der Luft wurden die Platten in System XXII in der gleichen Richtung chromatographiert.Nach Sichtbarmachung der Komponenten mit Jod bzw. Dithizonlösung zeigten sich hier neben den gesättigten Fettsäuremethylestern drei rosa gefärbte Flecke,die mit den zum Vergleich mitgelaufenen Quecksilber(II) - acetat - Addukten der Methylester von Ölsäure,Linolsäure und Linolensäure auf einer Höhe

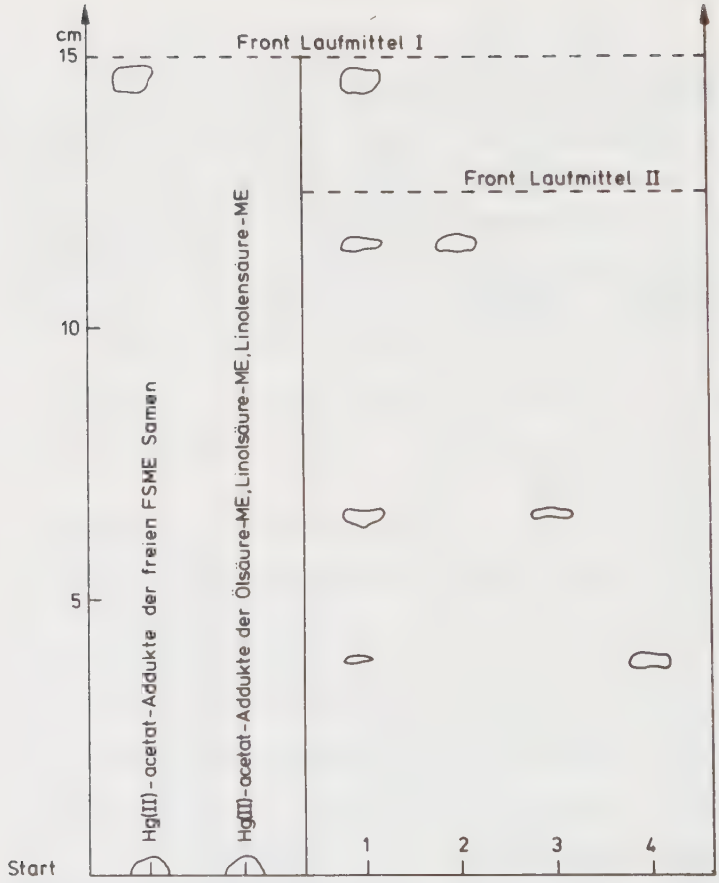


Abbildung 42 : Dc Trennung der gesättigten Fettsäuremethylester von den in die Hg(II) - acetat - Addukte überführten ungesättigten Fettsäuremethylestern sowie Auftrennung der letzteren nach Anzahl ihrer Doppelbindungen

1 = Fettsäuremethylester des Samens nach Hg(II) - acetat - Adduktbildung

2 = Hg(II) - acetat - Addukt des Ölsäuremethylesters

3 = Hg(II) - acetat - Addukt des Linolsäuremethylesters

4 = Hg(II) - acetat - Addukt des Linolensäuremethylesters

(I : System XXI ; II : System XXII, s.Exp.Teil, S. 165)

lagen.

Die gesättigten Fettsäuremethylester wurden mit Chloroform/ Methanol (4 : 1) aus dem Adsorbens eluiert und die ungesättigten Fettsäuremethylester aus den jeweiligen Adduktzonen ohne vorheriges Eluieren durch die Adduktspaltung nach GLASER und Mitarb. (1962) zurückgewonnen.

Die so erhaltenen einzelnen Fraktionen der Fettsäuremethylester wurden einzeln gc analysiert.In der Fraktion der gesättigten Fettsäuremethylester wurden Laurin-,Myristin-, Palmitin-,Margarin- und Stearinsäuremethylester identifiziert. Die Gesamtfraktion der ungesättigten Fettsäuremethylester

Tabelle 15 : Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Fraktion der freien und der gebunden vorliegenden Fettsäuren aus dem Samen (Relative Retentionszeit (RRT) bezogen auf Palmitinsäuremethylester : 15,6 Min.)

Fettsäuremethylester	RRT	freie FS %	geb. FS %
Laurinsäure	0,63	Spur	–
Myristinsäure	0,81	0,3	Spur
Palmitinsäure	1,00	49,3	5,4
Palmitoleinsäure	1,05	0,2	Spur
Margarinsäure	1,09	4,4	0,1
Stearinsäure	1,18	12,2	1,3
Ölsäure	1,24	28,7	12,2
Linolsäure	1,35	3,4	79,2
Linolensäure	1,55	1,5	1,7

erwies sich als ein Gemisch aus Palmitolein-,Öl-,Linol- und Linolensäuremethylester.Die Monoenfraktion bestand aus Palmitolein- und Ölsäuremethylester,in der Dienzone trat Linolsäuremethylester und in der Trienzone Linolensäuremethylester auf.

In Tabelle 15 ist die gc ermittelte prozentuale Zusammensetzung der im Samen frei und gebunden vorliegenden Fettsäuren zusammengefasst.Wie daraus hervorgeht,dominiert bei den freien Fettsäuren mit 49,3 % die Palmitinsäure,während bei den gebunden vorliegenden Fettsäuren mit 79,2 % die zweifach ungesättigte Linolsäure die Hauptkomponente stellt.

2. Die Fettsäuren des Callusgewebes

Wie auf S. 65 beschrieben,wurden aus 300 g Callusgewebe 0,17 g freie Fettsäuren und 1,78 g in Lipiden gebunden vorliegende Fettsäuren isoliert,entsprechend 0,06 bzw. 0,59 % vom Callustrockengewicht.Ihre Identifizierung erfolgte durch kombinierte Dünnschicht- und Gaschromatographie,wie bei den entsprechenden,aus Samen gewonnenen Fettsäurefraktionen bereits angegeben wurde.Abbildung 43 zeigt das Fraktogramm der Methylester der freien Fettsäuren,Abbildung 44 das der im Petrolätherextrakt des Callusgewebes gebunden vorliegenden Fettsäuren.

In Tabelle 16 ist die qualitative uns quantitative Zusammensetzung dieser beiden Fettsäurefraktionen wiedergegeben.So-

wohl bei den freien als auch bei den in den Lipiden gebundenen Fettsäuren des Callusgewebes dominiert mit 50 bzw. 38,9 % die Palmitinsäure,gefolgt von Linolsäure mit 27,2 bzw. 37,8 %.Bei den gebundenen Fettsäuren stellt noch die Linolensäure mit 11,2 % eine grössere Komponente,so dass hier insgesamt die ungesättigten Fettsäuren leicht vorherrschen (C_{18} : 1 , C_{18} : 2 , C_{18} : 3 insgesamt 51,7 % gegenüber 34,6 % bei den freien Fettsäuren).

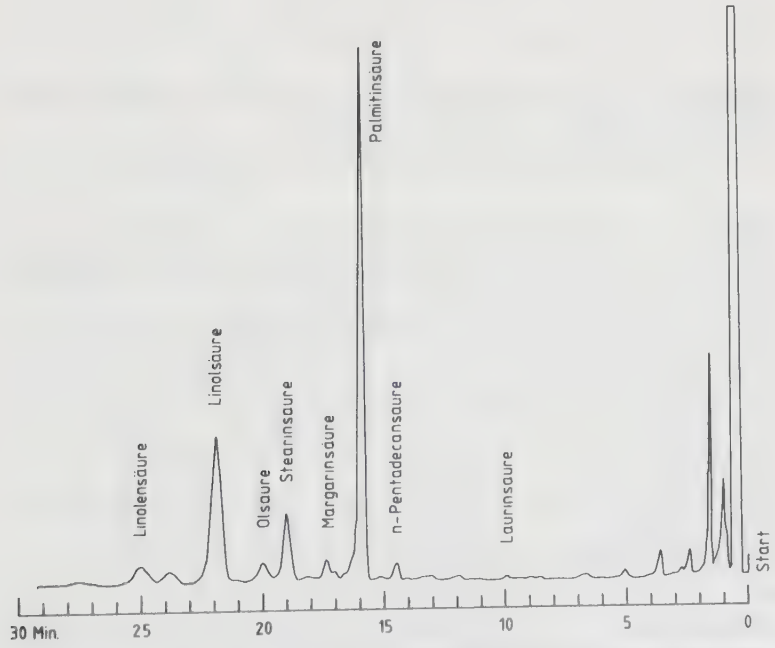


Abbildung 43 : GC der methylierten freien Fettsäuren aus dem Callusgewebe
(Säule : Diäthylenglycolsuccinat,System III,s.Exp.Teil,S. 167)

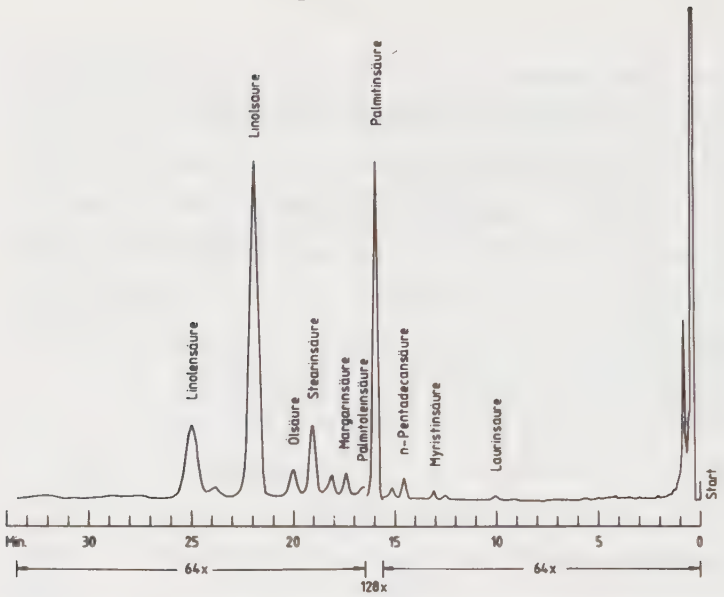


Abbildung 44 : GC der methylierten,in Lipiden gebunden vorliegenden Fettsäuren des Callusgewebes
(Säule : Diäthylenglycolsuccinat,System III,s.Exp.Teil,S. 167)

Tabelle 16 : Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Fraktionen der freien und der gebundenen Fettsäuren aus dem Callusgewebe (RRT bezogen auf Palmitinsäure : 15,6 Min.)

Fettsäuremethylester	RRT	freie FS %	geb. FS %
Laurinsäure	0,62	Spur	Spur
Myristinsäure	0,82	–	0,3
Pentadecansäure	0,91	4,1	1,1
Palmitinsäure	1,00	50,0	38,9
Palmitoleinsäure	1,01	0,2	Spur
Margarinsäure	1,09	2,0	1,7
Stearinsäure	1,19	9,1	6,2
Ölsäure	1,25	2,9	2,7
Linolsäure	1,37	27,2	37,8
Linolensäure	1,56	4,5	11,2

3. Zusammenfassung und Diskussion der Fettsäurenzusammensetzung des Samens und Callusgewebes von S. dulcamara

Die Samen von S. dulcamara führen 28 % eines mit Petroläther extrahierbaren fetten Öles.Der Gehalt liegt somit in dem Bereich,wie er für Reservestoffe von Solanaceen - Samen bisher angegeben wird (15 - 40 %,s. bei HEGNAUER 1972).7,8 % des fetten Öles werden von frei vorliegenden Fettsäuren gebildet,bei denen die gesättigten Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure mit zusammen 61,5 % die Hauptkomponente bilden. Bei den ungesättigten Fettsäuren stellt mit 28,7 % die Ölsäure (C_{18} : 1) die Hauptkomponente,während Linol- und Linolensäure (C_{18} : 2 bzw. C_{18} : 3) nur in Anteilen von 3,4 bzw. 1,5 % vorlagen.

Bei den in den Neutralfetten und anderen Lipiden gebunden vorliegenden Fettsäuren herrschen dagegen mit 93,1 % die ungesättigten C_{18} - Säuren vor.Mit 79,2 % ist hier die Linolsäure die bestimmende Fettsäure.Da der Hauptteil der Fettsäuren des Samenöles gebunden vorliegt,ist sie die charakteristische Fettsäure des Samenöles.Das Samenöl von S. dulcamara besitzt somit ein Fettsäuremuster,wie es allgemein bei den bisher untersuchten Solanaceen - Samen gefunden worden ist.So führt etwa der Samen von Solanum laciniatum 21,2 % eines fetten Öles,in dem Palmitinsäure,Öl- und Linolsäure überwiegen und die Linolsäure mit 66 - 69 % die Hauptkomponente stellt (KRSTIC - PAVLOVIC u. MIRIC 1972).Nach den

bisher vorliegenden Untersuchungen (s. bei HEGNAUER 1972) wurde in Samenölen von Solanaceen - Arten allgemein als Hauptfettsäure die Linolsäure beobachtet und nur in Ausnahmefällen Ölsäure gefunden.Die gesättigten Fettsäuren,vornehmlich Palmitin- und Stearinsäure,kommen danach nur in Mengen von 10 - 20 % der Totalfettsäuren vor.Wie die vorliegende Untersuchung zeigt,scheinen diese darüberhinaus bevorzugt frei vorzuliegen.

Die erste Publikation über das Fettsäuremuster der Gesamtlipide in pflanzlichen Zellkulturen stammt von GROB u. EICHENBERGER (1969).Die Autoren berichten,dass in Zellkulturen von Spirodela oligorrhiza die Palmitin-,Linol- und Linolensäure mit zusammen ca. 90 % der Gesamtfettsäuren die dominierenden Fettsäuren der Lipide sind,wobei Linolsäure die Hauptkomponente darstellte.WEETE (1971) fand in Kulturen von Nicotiana tabacum Linol- und Linolensäure als Hauptkomponente,gefolgt von Palmitin- und Ölsäure.TATTRIE u. VELIKY (1973) sowie RADWAN und Mitarb. (1974) stellten das Auftreten von Palmitin-,Linol- und Linolensäure als Hauptfettsäuren der Lipide in Callus- und Suspensionskulturen verschiedener Pflanzen fest.Auch im Callusgewebe von S. dulcamara wurden in der vorliegenden Untersuchung Palmitin-, Linol- und Linolensäure mit zusammen 87,9 % als Hauptfettsäuren der Lipide gefunden (s.Tab. 16).

RADWAN u. MANGOLD (1976) sowie MANGOLD (1977) haben zusammenfassend über die bisherigen Befunde des Fettsäuremusters der Lipide in pflanzlichen Zellkulturen berichtet.

Danach handelt es sich bei ihnen allgemein um gesättigte und ungesättigte C_{16} - und C_{18} - Säuren,wobei in der relativen Zusammensetzung kein einheitliches,charakteristisches Muster angegeben werden kann.Dieses hängt vielmehr von einer Vielzahl von Aussenfaktoren ab,die während des Wachstums der Zellkultur auf diese einwirken,wie z.B. die Zusammensetzung der Nährmedien,die Temperatur und bei Suspensionskulturen die Belüftungsintensität.

D. Zusammenfassung

1. Es wurden je 56 Medien mit verschiedenen IES/Kinetin - und 2,4 - D/Kinetin - Konzentrationen sowie 20 Medien mit NES/Kinetin - Konzentrationen auf ihre Fähigkeit zur Callusinduktion bei Blatt-,Spross- und Wurzelexplantaten der Soladulcidin-,Solasodin- und Tomatidenol - Sippe von Solanum dulcamara getestet.Als Basalmedium (BM) fanden die Mineralsalze,Saccharose und meso - Inosit des Nährmediums nach MURASHIGE u. SKOOG (1962) Verwendung.

2. Von Blatt- und Sprossexplantaten der Soladulcidin- und Solasodin - Sippe wurden erstmals Calluskulturen installiert.Wurzelexplantate konnten unter denselben Bedingungen in keinem der getesteten Medien zur Bildung eines Primärcallus' angeregt werden,desgleichen die Wurzel-, Blatt- und Sprossexplantate der Tomatidenol - Sippe.

3. Die beste Primärcallusbildung erfolgte auf einem Medium, das zusätzlich zum BM 1 ppm 2,4 - D und 0,05 ppm Kinetin enthielt.Andere Wuchsstoffkonzentrationen erwiesen sich als geeignet für eine Regeneration von Sprossen und/oder Wurzeln.

4. Bei der Verwendung von sterilen Keimpflanzenorganen der Soladulcidin - und Tomatidenol - Sippe konnten nur die Hypokotyl- und Kotyledonexplantate der Soladulcidin - Sippe zur Callusbildung angeregt werden.Die Radicula-explantate und alle Explantate der Tomatidenol - Keimlinge lieferten auch hier keine Primärcalli.Unterschiede zu den Calli aus den adulten Organen waren nicht erkennbar.

5. Die im Dauerdunkel gehaltenen Explantate zeigten generell eine bessere Callusbildung als die,die einem Hell/Dunkel - Rhythmus von 16 : 8 Std. ausgesetzt waren.

6. Versuche zur Optimierung des Calluswachstums der Blatt- und Sprosscalli der Soladulcidin - Sippe führten zu der Entwicklung des folgenden Nährmediums : BM nach MURASHIGE u. SKOOG (1962) + 1 ppm 2,4 - D + 0,05 ppm Kinetin + 1 ppm Gibberellinsäure GA_3 + Vitamine + 12 % Kokosmilch (s.S. 53).Im Dauerdunkel bei einer Raumtemperatur von 25 $\pm$ 1°C und 65 % Luftfeuchtigkeit konnten auf diesem Medium Calluskulturen mit einem Wachstumsquotienten von 5,5 innerhalb von fünf Wochen installiert werden.Auf diesem Medium wachsen die Spross- und Blattcalli der Soladulcidin - Sippe seit drei Jahren ohne Ermüdungs- oder Regenerationserscheinungen.

7. Die Primärcalli der Blatt- und Sprossexplantate der Solasodin - Sippe wurden auf dem gleichen Nährmedium, jedoch ohne Zusatz von Kokosmilch subkultiviert.Sie

konnten jedoch nur bis zur 11. Passage,d.h. nur wenig über ein Jahr lang am Leben erhalten werden.Der Wachstumsquotient betrug hier 1,35 innerhalb von 6 Wochen.

8. Die Steroidführung der Sprosscalluskultur der Soladulcidin - Sippe von S. dulcamara wird analysiert.
   a) Im Callusgewebe werden die Triterpene Cycloartenol, 24 - Methylencycloartanol,Cycloeucalenol und Obtusifoliol gc identifiziert.Sie sind Biosynthesevorstufen der Sterine.
   b) Die Sterine des Callus' wurden als Cholesterin,Campesterin,24 - Methylencholesterin,Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin gc und durch GC - MS - Analyse identifiziert.Das in den Sprossen der intakten Pflanze desselben Klons,von dem die Calluskultur installiert wurde,gebildete Brassicasterin wird vom Callus nicht synthetisiert.Er gleicht in seiner qualitativen Sterin zusammensetzung dem Samen dieses Klons.
   c) Die Sterine liegen im Samen wie in der intakten Pflanze sowohl frei als auch als Ester,Glykoside und Acyl - Glykoside vor.Bei den Steringlykosiden handelt es sich um Galaktoside,bei den Acyl - Steringlykosiden wurde Palmitinsäure als Säurekomponente identifiziert.
   d) Der Gesamtsteringehalt des Callusgewebes und der Anteil der genannten Sterinderivate wurde photometrisch bestimmt.Bezogen auf das Trockengewicht ist der Gesamtsteringehalt des Callus' mit 0,19 % doppelt so hoch wie der der Blätter desselben Klons.35,9 % der

Sterine lagen frei vor,4,7 % als Ester und 59,4 % als Glykoside und Acyl - Glykoside.

e) In dem Spross- und Blattcallusgewebe der Soladulcidin - Sippe konnten in Spuren das für diese Sippe charakteristische Steroidalkaloid Soladulcidin und das sauerstoff - analoge Steroidsapogenin Tigogenin nachgewiesen werden.Der fördernde Einfluss von 2,4 - D auf die Bildung von Steroidalkaloiden durch Calluskulturen von Solanum - Arten wird diskutiert.

9. Als dominierende Fettsäuren in den Lipiden des Callusgewebes von S. dulcamara wurden Palmitin-,Linol- und Linolensäure identifiziert,die mit zusammen 87,9 % die Hauptkomponenten der gebundenen Fettsäuren stellen.

10. Die Steroidführung des Samens von S. dulcamara wird erstmals analysiert.

a) Im Samen der Soladulcidin - Sippe wurden die Steroidsapogenine Tigogenin und Diosgenin und die Steroidalkaloide Soladulcidin und Solasodin identifiziert. Der Same unterscheidet sich damit von den vegetativen Teilen dieses Klons,die nur Tigogenin und Soladulcidin bilden.Die Spirostanole liegen genuin als Furostanolglykoside vor.

b) Die Sterine des Samens wurden als Cholesterin,Campesterin,24 - Methylencholesterin,Stigmasterin,Sitosterin und Isofucosterin gc identifiziert.Das in den vegetativen Teilen dieses Klons nachgewiesene Brassica-

sterin wurde im Samen nicht gefunden.

c) Als Triterpene wurden im Samen Cycloartenol,24 - Methylencycloartanol,Cycloeucalenol und Obtusifoliol gc identifiziert.

11. Die Samen von S. dulcamara führen 28 % fettes Öl.Die Hauptfettsäuren sind Palmitin-,Öl- und Linolsäure mit zusammen über 90 %.Hauptkomponente ist mit ca. 78 % die Linolsäure.Das Fettsäuremuster entspricht damit den bisher vorliegenden Daten für Solanaceen - Samen.

E. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Angaben

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Leitz Mikroskopheiztisch 350 bestimmt,die spezifische Drehung mit dem Perkin - Elmer Polarimeter 243 bei 20°C in Chloroform gemessen.Die Aufnahme der Infrarotspektren erfolgte mit dem Infrarot Spektrophotometer 297 von Perkin - Elmer in KBr - Presslingen.Die Massenspektren der Sterine wurden mit dem Massenspektrometer Finnigan 3500 mit GC - MS - Kopplung aufgenommen.*

2. Chromatographische Methoden

2.1. Schichtchromatographie

Für die analytische DC benötigte Platten wurden mit der Grundausrüstung Nr. 600 der Fa. Desaga/Heidelberg hergestellt.Das Adsorbens wurde als Suspension in 0,25 mm Schicht-

---

* Herrn Dr.H.-J.Hemmerling,Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf,danke ich für die Aufnahme der GC - MS - Spektren.

dicke aufgetragen und die lufttrockenen Platten eine Stunde lang bei 110°C im Trockenschrank aktiviert.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur präparativen Trennung geringer Substanzmengen kamen Aluminium - und Plastikfolien - Fertigplatten mit Kieselgel 60 (Merck) zur Anwendung.Pro Platte wurden bis zu 10 mg Substanz mit Hilfe des Microdosers nach DIBBERN (Desaga) oder des Autoliners 75 nach STAHL (Desaga) aufgetragen.Nach Entwicklung der Platten wurde in der Mitte ein Streifen herausgeschnitten,detektiert und wieder in die Folie eingesetzt.In Anlehnung an diesen Strip wurden die entsprechenden Zonen aus den Folien ausgeschnitten und die Substanzen mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (1 : 1 ; v : v) durch Übertropfen der Streifen eluiert.Da das Kieselgel sehr fest an den Folienplatten haftet,bleibt das Eluat nahezu frei von Kieselgelpartikeln.Die Vollständigkeit der Elution kann durch Detektion eines solchen Streifchens nach dem Eluieren überprüft werden (DIBBERN et al. 1971).

Präparative Dickschichtchromatographie

Die Auftrennung grösserer Substanzmengen erfolgte an 0,5 - 1 mm starken Dickschichtplatten.Zur Herstellung von drei 0,5 mm dicken Platten wurden 40 g Adsorbens mit 80 g Wasser angerührt.Die Lokalisierung der gesuchten Zonen erfolgte durch Detektion eines schmalen Mittelstreifens der Platte, nachdem der Rest sorgfältig abgedeckt und gegen Erhitzen ge-

schützt worden war.Aus den ausgekratzten Adsorbenszonen wurden die Substanzen 5mal mit der 10fachen Menge eines Chloroform/Methanol - Gemisches (1 : 1) auf dem Magnetrührer je eine Stunde eluiert.Nach Abziehen des Lösungsmittelgemisches am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und durch ein gehärtetes Filterpapier filtriert,um die mit - eluierten Kieselgelreste zu entfernen.

2.2. Dünnschichtchromatographische Trennsysteme und Detektionsverfahren

Als Adsorbens diente,soweit nichts anderes angegeben,jeweils Kieselgel G (Merck) bzw. DC - Alufolien mit Kieselgel 60 (Merck).

a) Triterpene und Sterine

System I : Petroläther/Essigsäureäthylester/Benzol = 80 : 15 : 5 (v : v : v),(SCHREIBER u. OSSKE 1962)

Die Detektion erfolgte mit Molybdato - H_3PO_4 - Reagenz und LIEBERMANN - BURCHARD - Reagenz.

Molybdato - H_3PO_4 - Reagenz : Das Reagenz besteht aus 2 % Phosphormolybdänsäure,10 % Wasser sowie konz. H_2SO_4 und konz. H_3PO_4 zu gleichen Teilen ad 100 ml.Nach Erhitzen der besprühten Platten auf 110°C für 5 Min. färben sich die Δ^5 - Sterine rot bis blauviolett,die Triterpene (Δ^7 - Steri-

ne) braun bis braunviolett (FISCHER u. HÄRTEL 1968).
LIEBERMANN - BURCHARD - Reagenz wurde hergestellt aus Acetanhydrid und konz. H_2SO_4 im Verhältnis 10 + 1.Nach Besprühen und Erwärmen auf 110°C für 3 - 4 Min. färben sich die Δ^5 - Sterine tiefblau,nach einiger Zeit grün,die Triterpene braun bis braunviolett.

System II : Chloroform/Äthanol = 99 : 1 (v : v) (EICHENBERGER u. GROB 1970)

System III : Benzol/Äther = 9 : 1 (v : v)

System IV : Adsorbens : Kieselgel H mit 20 % Silbernitrat oder Kieselgel 60 Alufolien (MERCK),imprägniert mit Silbernitrat
Laufmittel : n - Hexan/Benzol = 1 : 1 (v : v) (EVANS 1973)

Dieses System wurde zur Auftrennung der acetylierten Sterine benutzt,die nach Anzahl und Lage der Doppelbindungen erfolgt. Die Detektion erfolgte wie bei System I angegeben.
Zur Herstellung von 5 Platten (20 x 20 cm) mit einer Schichtdicke von 0,25 mm wurden 30 g Kieselgel H mit einer Lösung von 12 g $AgNO_3$ in 60 ml Wasser angerührt und auf die Platten aufgetragen.
Zur Imprägnierung der DC - Folien wurden diese für 1 Min. in eine 20 %ige methanolische Silbernitratlösung eingetaucht.Nach kurzem Trocknen bei Zimmertemperatur blieben

die Folien eine Stunde lang bei 70°C im Trockenschrank.Die Aufbewahrung der mit $AgNO_3$ imprägnierten Platten erfolgte unter Lichtabschluss.

b) Steringlykoside und Acyl - Steringlykoside

System V : Chloroform/Methanol = 6 : 1 (v : v) (EICHENBERGER u. GROB 1970)

In diesem System liessen sich Steringlykoside,Acyl - Steringlykoside und freie Sterine gut voneinander trennen.Die Detektion erfolgte wie bei System I beschrieben.

c) Zucker

System VI : Adsorbens : Kieselgur G,mit Phosphatpufferlösung anstelle des Wassers angerührt
Laufmittel : n - Butanol/Aceton/Phosphatpufferlösung = 40 : 50 : 1 (v : v : v) (WALDI 1965)

Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit Anisaldehyd - H_2SO_4 - Reagenz.

Anisaldehyd - H_2SO_4 - Reagenz : 0,5 ml Anisaldehyd werden in eine Mischung von 85 ml Methanol,10 ml Eisessig und 5 ml H_eSO_4 konz. gegeben.Das Reagenz dient zur Detektion von Zuckern und Steroiden.Nach dem Besprühen wird 5 Min. lang auf 110°C erwärmt.

d) Steroidalkaloidglykoside

System VII : Äthanol/Chloroform/1 %ige wässrige NH_3 - Lösung

= 3 : 3 : 1 (v : v : v)

System VIII : Essigsäureäthylester/Pyridin/Wasser = 3 : 3 : 1 (v : v : v)

System XI : Chloroform/Essigsäure/Methanol = 50 : 5 : 45 (v : v : v)

System X : Aceton/Methanol = 1 : 1 (v : v)

System XI : Chloroform/Methanol/1%-ige NH_3-Lösung = 2 : 2 : 1 (v : v : v)

Die Detektion erfolgte mit Anisaldehyd - H_2SO_4, DRAGENDORFF - Reagenz und Antimon(III) - chlorid - Reagenz.

DRAGENDORFF - Reagenz nach MUNIER und MACHEBOEUF :

Lösung A : 0,85 g basisches Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.

Lösung B : 8 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst.

Vor Gebrauch werden je 2,5 ml der Lösungen A und B mit einer Mischung von 50 ml Wasser und 10 ml Eisessig zusammengegeben. Das Reagenz dient zum Nachweis von Alkaloiden und anderen stickstoffhaltigen Verbindungen, die als orangegelbe Flecke erscheinen.

Antimon(III) - chlorid - Reagenz : 25 g Antimon(III) - chlorid werden in 75 g Chloroform gelöst. Nach dem Besprühen wird 10 Min. lang auf 100°C erwärmt.

e) Steroidalkaloide

System XII : Cyclohexan/Essigsäureäthylester/Wasser = 60 40 : 0,5 (v : v : v)

System XIII : Chloroform/Methanol = 95 5 (v : v) (BOLL, ANDERSEN 1962)

Die Detektion erfolgte wie bei den Steroidalkaloidglykosiden angegeben,sowie mit Vanillin - H_3PO_4 - Reagenz.

Vanillin - H_3PO_4 - Reagenz : 1 g Vanillin wird in 100 ml Phosphorsäurelösung (50 %ig in Wasser) gelöst.Nach zehnminütigem Erwärmen erscheinen die steroiden Verbindungen als violette,gelbliche oder blaue Flecke

System XIV : Chloroform/Methanol = 9 : 1 (v : v)

System XV : Cyclohexan/Essigsäureäthylester = 3 : 7 (v : v)

Das System kann auch zur Trennung von Steroidsapogeninen verwendet werden.Detektion mit Anisaldehyd - H_2SO_4.

System XVI : Adsorbens : silbernitratimprägnierte Kieselgel 60 - Alufolien (Merck)
Laufmittel : Chloroform/Methanol = 95 : 5 (v : v)

f) Steroidsaponine

System XVII : n - Butanol/Äthanol/Wasser = 5 : 1 : 3 (v : v) (DRAGALIN 1975)

Detektion mit EHRLICH's Reagenz : 1 g Dimethylaminobenz aldehyd wird in einer Mischung von 25 ml konz. HCl und 75 ml Methanol gelöst.Nach dem Besprühen wird kurzzeitig auf 100°C erhitzt.Die Furostanolglykoside erscheinen rot, die Spirostanolglykoside gelb.

g) Steroidsapogenine

System XVIII : Adsorbens : silbernitratimprägnierte Kieselgel 60 - Alufolien (Merck)
Laufmittel : Chloroform/Äther/Essigsäure = 97 2 5 : 0,5 (v : v : v)

h) Fettsäuren

System XIX : Chloroform/Essigsäureäthylester/Ameisensäure - 90 : 10 . 2 (v : v : v) (REHM 1967)

In diesem System lassen sich gesättigte und ungesättigte n - Fettsäuren von Oxo-,Hydroxy- und Epoxyfettsäuren abtrennen.Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenz - Indikator Pyranin (3 - Hydroxy - pyren - 5,8,10 - trisulfonsaures Natrium,Fa. Bayer Leverkusen).Dieser ergibt,als 0,015 %ige wässrige Lösung auf die Platten aufgesprüht oder in gleicher Konzentration in das zum Anrühren des Kieselgels verwendete Wasser gegeben,im UV - Licht bei 360 nm eine hellblaue Fluoreszenz der Fettsäuren auf gelblich - grünem Grund.

i) Fettsäuremethylester

System XX : Pentan/Äther = 9 : 1 (v : v)
Detektion mit Pyranin

System XXI : Adsorbens : Kieselgel H/Kieselgur = 3 : 7 (g : g) (WAGNER u. POHL 1964)
Laufmittel : Petroläther/Äther = 4 : 1 (v : v) (MANGOLD u. KAMMERECK 1961)

Dieses System ermöglicht die Abtrennung gesättigter Fettsäuremethylester,die mit der Fliessmittelfront wandern,von den Hg(II) - acetat - Addukten der ungesättigten Fettsäuremethylester,die am Start liegenbleiben.Die Hg(II) - acetat - Addukte der ungesättigten Fettsäuremethylester färben sich nach Besprühen mit einer 0,1 %igen äthanolischen Dithizon - Lösung rosa,während die gesättigten Verbindungen beim Einstellen der Platte in eine Jodkammer als braune Flecke erscheinen (vgl. KATING et al. 1970).

System XXII : Adsorbens : Kieselgel H/Kieselgur = 3 : 7 (g : g) (WAGNER u. POHL 1964)
Laufmittel : n - Propanol/Eisessig = 100 : 1 (v : v) (MANGOLD u. KAMMERECK 1961)

In diesem Gemisch lassen sich Gemische ungesättigter Fettsäuremethylester als Hg(II) - acetat - Addukte nach der Anzahl ihrer Doppelbindungen auftrennen.

2.3. Säulenchromatographie

Als Adsorbens für die säulenchromatographischen Trennungen wurde Aluminiumoxid neutral (Fa. Woelm,Eschwege) der Aktivitätsstufe II sowie Kieselgel für die Säulenchromatographie 230 - 400 mesh (Merck) verwendet.Die Füllung erfolgte durch Suspension im Elutionsmittel.

2.4. Gaschromatographie

2.4.1. Geräte

Verwendet wurde der Becker Gaschromatograph 419 der Fa. Packard mit FID und dem Servogor Kompensationsschreiber RE 511 sowie der Perkin - Elmer Gaschromatograph F 22 mit dem Kompensationsschreiber 56 sowie dem Integrator M 1. Der Papiervorschub betrug jeweils 1 cm/Min..Als Trägergas kam hochgereinigter Stickstoff zur Anwendung.

2.4.2. Gaschromatographische Trennsysteme

System I : Stahlsäule (Fa. Perkin - Elmer),Länge 2 m,Durchmesser 2 mm.Stationäre Phase : 3 % Silikongummi SE 30 auf Chromosorb G,AW - DMCS,80 - 100 mesh. Injektortemp. 270°C,Detektortemp. 300°C

System II : Glassäule (Fa. Perkin - Elmer),Länge 2 m,Durchmesser 2,5 mm.Stationäre Phase : 3 % Silikonöl OV 17 auf Gas Chrom Q,100 - 120 mesh,on column. Injektortemp. 280°C,Detektortemp. 300°C

System III : 1 Paar Stahlsäulen (Fa. Supelco),Länge 2 m, Durchmesser 2 mm.Stationäre Phase : 10 % Diäthylenglycolsuccinat auf Supelcoport 80 - 100 mesh.
Injektortemp. 230°C,Detektortemp. 230°C

2.4.2.1. Gaschromatographie der Triterpene und Sterine

System I ,isotherm,Säulentemp. 270°C,Strömungsgeschwindigkeit 34 ml/Min..
Retentionszeit (RT) Cholesterin : 12,6 Min.
RT Cholesterinacetat : 16,8 Min.

System II ,isotherm,Säulentemp. 270°C,Strömungsgeschwindigkeit 50 ml/Min.
RT Cholesterin : 21,2 Min.
RT Cholesterinacetat : 23,8 Min.

2.2. Gaschromatographie der Fettsäuren

System III,programmiert,Säulentemp. 60 - 180°C,Anstiegrate 6°C/Min.,Strömungsgeschwindigkeit 30 ml/Min.
RT Palmitinsäuremethylester : 15,6 Min.

2.5. Herstellung der zur Identifizierung benötigten Derivate

2.5.1. Acetatbildung

Die zur Identifizierung der Triterpene und Sterine herangezogenen Acetylderivate wurden nach der von MATSUO und Mitarb. (1972) beschriebenen Methode hergestellt.
50 mg des betreffenden Alkoholes wurden in einer Mischung von 1,5 ml Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.Nach Verdünnen des Reaktionsgemisches mit ca. 15 ml Wasser wurden die Acetate fünfmal mit jeweils 3 ml Petroläther ausgeschüttelt und nach Trocknung über Na_2SO_4 sicc. am Rotavapor zur Trockne gebracht.Notwendige Reinigungen wurden durch Umkristallisation oder Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60 - Alufolien (Merck) vorgenommen.

2.5.2. Bildung der Methylester

Einige mg der Fettsäurefraktionen des Samens und des Callus' wurden in wenig Äther gelöst und bis zur beständigen Gelbfärbung mit einer ätherischen Diazomethanlösung im Überschuss versetzt.Nach 24 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und die Fettsäuremethylester dc gereinigt.

Zur Herstellung der ätherischen Diazomethanlösung wurden

10 g N - Methyl - N - nitroso - p - toluolsulfonamid (Merck - Schuchardt) in 100 ml Äther gegeben und mit einer Kältemischung auf ca. - 15°C gekühlt.Bei der darauffolgenden Zugabe von 70 ml einer 0,75 N äthanolischen Natronlauge musste darauf geachtet werden,dass die Temperatur unter - 5°C blieb. Nach 10 Minuten wurde die ätherische Diazomethanlösung in eine gekühlte Vorlage überdestilliert.Die Lösung bleibt bei kühler Aufbewahrung tagelang brauchbar.

3. Der Samen

3.1. Herkunft der Samen und Herstellung des Petroläther-extraktes

Die Samen wurden aus reifen Früchten der Soladulcidin - Sippe geerntet,die als Klon (DW_3) im Botanischen Garten der Universität Marburg/Lahn und zur Zeit auf dem Versuchsfeld des Institutes für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf in Kultur gehalten wird.
550 g gemahlener Samen wurden 7 Tage lang mit Petroläther (40 - 60°C) im Soxhlet erschöpfend extrahiert.Ausbeute : 154,3 g einer öligen Masse (≙ 28,1 % vom Samengewicht).

3.2. Gewinnung des basischen Gesamt - Steroidglykosidextraktes

Die basischen Gesamt - Steroidglykoside wurden nach einem

für die Isolierung von Glykoalkaloiden aus Solanum - Arten üblichen Extraktionsverfahren gewonnen (u.a. KUHN u. LÖW 1947).Das zuvor mit Petroläther erschöpfend extrahierte Samenpulver wurde mit soviel 3 %iger Essigsäure versetzt und verrührt,dass das Samenpulver gut mit der Säure bedeckt blieb.Nach einstündiger Extraktion im heissen Wasserbad wurde abgenutscht und der Vorgang dreimal wiederholt.Die vereinigten und filtrierten essigsauren Auszüge wurden auf 70°C erwärmt und mit konz. Ammoniaklösung bei pH 9 die basischen Rohglykoside ausgefällt.Nach dem Absetzen wurde die Hauptmenge des Überstandes dekantiert,der Niederschlag auf einem Filter gesammelt und mit schwach ammoniakalischem Wasser nachgewaschen.Die braunen Rohglykoside wurden bei 50°C getrocknet und die Ausbeute (26,3 g) samt Filter viermal eine Stunde lang mit jeweils der 100fachen Menge Methanol auf dem siedenden Wasserbad unter Rückflusskühlung extrahiert.Die vereinigten Auszüge wurden im Vakuum bis zu einer sirupartigen Konsistenz eingeengt,mit 3 %iger Essigsäure heiss aufgenommen,filtriert und aus dem Filtrat bei 60 - 70°C die basischen Gesamt - Steroidglykoside mit konzentrierter Ammoniaklösung ausgefällt.Ausbeute : 2,76 g (≙ 0,50 % vom Samengewicht).

3.2.1. Gewinnung der basischen Steroidaglyka

38 mg der Steroidalkaloidglykosidfraktion wurden 4 Std. lang

in 2 ml methanolischer HCl (88 ml Methanol + 12 ml HCl) am Rückfluss im Wasserbad bei 60°C hydrolysiert.Anschliessend wurden 12 ml aqua dest. zugegeben und der Ansatz über Nacht im Kühlschrank stehengelassen.Am nächsten Tag konnte das ausgefallene Hydrochlorid der Aglyka abzentrifugiert werden.Es wurde in wenig 70 %igem Methanol gelöst,mit einer verdünnten Ammoniaklösung bis pH 10 alkalisiert und bei Zimmertemperatur abrotiert.Ausbeute : 3,4 mg Aglyka.

3.3. Gewinnung der neutralen Steroidglykoside

Zur Isolierung der Steroidsapogenine wurde das nach Ausfällung der Steroidalkaloidglykoside anfallende ammoniakalische Filtrat fünfmal mit je einem Drittel des Volumens n - Butanol ausgeschüttelt (SANDER 1961) und der Butanolextrakt im Vakuum zur Trockne eingedampft.Der Rückstand (17,04 g) wurde in der hundertfachen Menge 2 N methanolischer HCL gelöst und vier Stunden lang unter Rückflusskühlung auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert.Das erkaltete Hydrolysat wurde mit konz. Ammoniaklösung neutralisiert,im Vakuum auf die Hälfte eingeengt,etwas Wasser zugesetzt und viermal mit der Hälfte des Volumens Chloroform ausgeschüttelt.Nach Abdampfen des Chloroforms im Vakuum blieb ein Rückstand von 2,82 g (≙ 0,51 % vom Samengewicht),in dem die aus ihrer glykosidischen Bindung befreiten Steroidsapogenine vorlagen.

3.3.1. Säulenchromatographische Abtrennung der Steroidsapogenine

2,82 g der Steroidsapogeninfraktion wurden an 600 g neutralem Aluminiumoxid (Woelm,Aktivitätsstufe I) sc aufgetrennt (Säulenlänge 43 cm,Säulendurchmesser 3 cm).Die Steroidsapogeninfraktion wurde in 200 ml heissem Benzol gelöst an 15 g Al_2O_3 adsorbiert,am Rotationsverdampfer getrocknet und als Schicht auf die Säule aufgebracht.Die Elution erfolgte in der Reihenfolge

Elutionsgemisch	Verhältnis	Menge (ml)
Benzol / Äther	80 : 20	1000
Benzol / Äther	60 : 40	1000
Benzol / Äther	40 : 60	2000
Benzol / Äther	20 : 80	2000
Äther		2000
Äther / Aceton	75 : 25	2000
Äther / Aceton	50 : 50	1500
Äther / Aceton	25 : 75	1100
Aceton		2000
Methanol		3000

Es wurden Fraktionen von ca. 20 ml aufgefangen und dc untersucht.Die Steroidsapogenine kamen mit Äther und Äther/Aceton von der Säule (Fraktionen 352 - 495).Die Rückstände

der Fraktionen 361 - 363 , 385 - 401 und 409 - 413,die mit 23 , 157 und 60 mg gewichtsmässig die Grössten waren,lagen bereits nach Abdampfen des Elutionsmittels in schwach gelb gefärbten,nadelförmigen Kristallen vor.Die anderen steroidsapogeninhaltigen Fraktionen lieferten klebrige,braun gefärbte Rückstände.Zur Identifizierung der Steroidsapogenine wurde der kristallin anfallende Hauptteil herangezogen.

3.3.2. Schichtchromatographische Reinigung und präparative Auftrennung

200 mg der kristallinen Spirostanolfraktion wurden an 14 Kieselgel G - Platten mit einer Schichtdicke von 0,5 mm wie bereits beschrieben (s.S. 158 f) im System XV gereinigt. Die Elution des abgekratzten Adsorbens mit Chloroform/Methanol (1 : 1) ergab nach Abdampfen des Elutionsmittels einen Rückstand von 115 mg.Dieser wurde anschliessend an 15 Kieselgel 60 - Alufolien (Merck),die mit $AgNO_3$ imprägniert waren,in System XVIII aufgetrennt.Die Platten liefen zweimal über eine Strecke von jeweils 15 cm.Zwischen der ersten und zweiten Entwicklung wurden sie an der Luft getrocknet. Nach Ausschneiden der beiden Sapogeninzonen wurden die Strips durch Auftropfen des Elutionsmittels Chloroform/Methanol (1 : 1) eluiert und aus Aceton umkristallisiert.Ausbeute

Substanz mit hRf - Wert von 46 : 74,6 mg

Substanz mit hRf - Wert von 41 : 5,3 mg.

3.4. Gewinnung der Sterinfraktion

3.4.1. Gewinnung des unverseifbaren Anteiles vom Petrolätherextrakt

91 g des von freien Fettsäuren befreiten Petrolätherextraktes (s.S. 187) wurden nach Angaben von SCHREIBER u. OSSKE (1962) mit 700 ml methanolischer KOH (125 g KOH,60 g H_2O, 800 g Methanol) 150 Min. lang unter Rückflusskühlung zum Sieden erhitzt.Nach Zugabe von 700 ml Wasser wurde der Ansatz weitere 30 Min. lang am Rückfluss gekocht.Nach Erkalten wurde das Hydrolysat 5 mal mit je 240 ml Petroläther/Äther (1 : 1 ; v : v) ausgeschüttelt.Die vereinigten organischen Phasen wurden je einmal mit Wasser und mit 50 %igem Methanol gewaschen und über Na_2SO_4 sicc. getrocknet.Nach Abziehen des Lösungsmittels blieben 1,8 g Unverseifbares zurück (≙ 0,5 % vom Samengewicht).Aus dem Hydrolysat wurden nach Ansäuern mit HCl die Fettsäuren isoliert (s. 5.2., S. 188).

3.4.2. Gewinnung der freien und der verestert vorliegenden Sterine durch Säulenchromatographie

40 g des Petrolätherextraktes wurden an 1000 g Kieselgel für die Säulenchromatographie (Merck,Aktivitätsstufe II) sc aufgetrennt.Die Länge der Säule betrug 60 cm,der Durchmesser 7 cm.Eluiert wurde mit 5000 ml Petroläther sowie

mit Petroläther mit 10 % (6000 ml) bzw. 20 % (16000 ml) Ätherzusatz.Es wurden Fraktionen von 18 ml aufgefangen und dc in System I untersucht.Alle Fraktionen mit Komponenten auf der Höhe von mitchromatographiertem Cholesterinoleat wurden zu einer "Esterfraktion" vereinigt.Ausbeute : 33,1 g. Nach einer Zwischenfraktion,die nicht reine Ester enthielt, verliessen die freien Sterine die Säule.Ausbeute : 0,5 g. Die danach noch auf der Säule verbliebenen Substanzen wurden mit Methanol heruntergewaschen (Tab. 17).

3.4.3. Isolierung der im Samen verestert vorliegenden Sterine

Zur Isolierung der im Samen verestert vorliegenden Sterine wurde die Esterfraktion (33,1 g) in 255 ml methanolischer KOH wie unter 3.4.1. beschrieben hydrolysiert.Aus dem erhaltenen unverseifbaren Anteil (0,77 g) wurde die Sterinfraktion durch präparative Dickschichtchromatographie isoliert.Das Unverseifbare wurde über 38 Kieselgel G - Platten (Schichtdicke 0,5 mm;20 mg Unverseifbares/Platte) in System I aufgetrennt.Die Zone der Sterine wurde von den Platten abgekratzt und viermal je eine Stunde mit Methanol/Chloroform (1 : 1 ; v : v) eluiert.Anschliessend erfolgte eine weitere Reinigung über Kieselgel 60 - Alufolien (Merck).Ausbeute : 0,13 g.

Tabelle 17 : Säulenchromatographische Auftrennung des Petrolätherextraktes

Fraktion	vereinigt zu Fraktion	Lösungsmittelgemisch	Rückstand (g)	Zusammensetzung
1- 155		Petroläther	–	–
156- 354	I	Petroläther	1,3	Alkane, Wachse
355- 731	II	Petroläther + 10 % Äther	33,1	Alkane, Wachse, Triterpen- u.Sterinester,Neutralfette
732- 834	III	Petroläther + 20 % Äther	0,99	u.a.Triterpen- u.Sterinester, freie Triterpene
835-1015	IV	Petroläther + 20 % Äther	0,74	u.a.Triterpen- u.Sterinester, freie Triterpene, Lophenole
1016-1033	V	Petroläther + 20 % Äther	0,50	freie Triterpene, Lophenole, Sterine
1034-Ende	VI	Methanol	0,84	unbekannt

3.4.4. Isolierung der im Samen frei vorliegenden Sterine

Die Isolierung der frei vorliegenden Sterine erfolgte aus der sc gewonnenen Fraktion V (0,50 g,s.Tab. 17) wie unter 3.4.3. beschrieben.

3.4.5. Isolierung der Sterine aus dem Unverseifbaren des Petrolätherextraktes

Die Isolierung der frei und verestert vorliegenden Sterine erfolgte aus dem Unverseifbaren vom Petrolätherextrakt durch Dickschichtchromatographie und anschliessende Reinigung über Kieselgel 60 - Alufolien wie unter 3.4.3. beschrieben. Ausbeute : 0,102 g Sterine.

3.5. Gewinnung der Triterpenfraktion aus dem unverseifbaren Anteil des Petrolätherextraktes

Die Isolierung der Triterpenfraktion erfolgte gleichzeitig mit der der Sterinfraktion (3.4.5.) durch präparative Dickschichtchromatographie in System I.Ausbeute : 0,38 g.Die wachsig - ölige Form,in der die Triterpene vorlagen,deutete auf eine Verunreinigung mit langkettigen aliphatischen Alkoholen hin,die in dem Trennsystem gleiches Laufverhalten zeigen.

Langkettige aliphatische Alkohole können über die Bildung von Harnstoffaddukt - Verbindungen von zyklischen Alkoholen abgetrennt werden (SCHLENK 1949).Dazu wurde die erhaltene Triterpenfraktion (0,38 g) in 13 ml Benzol gelöst und im Wasserbad auf 60°C erwärmt.Eine gesättigte Harnstofflösung (100 g Harnstoff auf 180 ml Methanol p.A.) wurde auf dieselbe Temperatur gebracht und beide Lösungen miteinander ver-

einigt.Die Addukte fallen hierbei sofort aus.Nach Erkalten der Lösung unter ständigem Rühren und anschliessendem Abnutschen wurde mit 30 ml eiskalter,gesättigter methanolischer Harnstofflösung sowie mit kaltem Methanol nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mir der vierfachen Menge einer gesättigten wässrigen NaCl - Lösung verdünnt.Die dabei auftretende Benzolphase wurde im Scheidetrichter abgetrennt und die wässrig - methanolische Phase dreimal mit Petroläther (50 - 70°C) im Verhältnis 2 : 1 ausgeschüttelt. Nachdem die vereinigten Benzol- und Petrolätherphasen mit gesättigter NaCl - Lösung gewaschen,über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum eingedampft worden waren,verblieben 0,34 g Triterpenalkohole.Die weitere Reinigung erfolgte dc über Kieselgel 60 - Alufolien (Merck) in System I.

4. Der Callus

4.1. Herstellung des Petrolätherextraktes

300 g gefriergetrockneter,gemahlener Sprosscallus A (s.S. 53) wurden vier Tage lang mit Petroläther (40 - 60°C) im Soxhlet erschöpfend extrahiert.Ausbeute : 5,6 g (≙ 1,87 % des Callustrockengewichtes).

4.2. Gewinnung des unverseifbaren Anteiles des Petrolätherextraktes

Die Gewinnung des unverseifbaren Anteiles erfolgte wie beim Samen unter 3.4.2. beschrieben.Ausbeute : 0,63 g (≙ 0,21 % vom Callustrockengewicht).

4.3. Gewinnung der Sterin- und Triterpenfraktionen aus dem unverseifbaren Anteil

Der unverseifbare Anteil wurde an 60 g Kieselgel säulenchromatographisch aufgetrennt.Die Säulenlänge betrug 40 cm, der Durchmesser 2,5 cm.Es wurden Fraktionen von 20 ml aufgefangen.Die Auftrennung erfolgte mit 100 ml Petroläther und anschliessend mit Petroläther/Äther - Gemischen,bei denen der Ätheranteil nach jeweils 100 ml um 10 % erhöht wurde.Nachdem die Sterine die Säule verlassen hatten,wurde diese mit Methanol leergewaschen (s.Tab. 6,S. 66).Ausbeute : 0,37 g reine Sterine und 0,08 g dc noch nicht reine Triterpene.

4.3.1. Isolierung der Triterpenfraktion

Die Triterpene wurden zur gc Analyse durch präparative Dickschichtchromatographie an vier Kieselgel G - Platten

in System I gereinigt.Die Elution erfolgte wie unter 1.1. beschrieben.Ausbeute : 2,9 mg farbloser Kristalle.

4.4. Gewinnung von Steringlykosiden und Acyl - Steringlykosiden

294 g des mit Petroläther entfetteten Calluspulvers wurden im Soxhlet drei Tage lang mit Aceton extrahiert und der Extrakt eingeengt.Bereits bei der Extraktion bildete sich ein Niederschlag,der vor dem Einengen des Extraktes abfiltriert wurde (Rückstand 3,90 g).Nach Abziehen des Acetons blieben 2,52 g Rückstand,so dass der Acetonextrakt insgesamt 6,62 g (≙ 2,25 % vom Callustrockengewicht) betrug.
In beiden Rückständen waren dc in System V Steringlykoside und Acyl - Steringlykoside nachweisbar.Zu ihrer Isolierung wurde der Niederschlag sc an 100 g Kieselgel aufgetrennt. Die Länge der Säule betrug 40 cm,der Durchmesser 2,8 cm.Es wurden Fraktionen von 10 - 15 ml aufgefangen.Als Laufmittel diente Chloroform,dem pro 1000 ml jeweils 2 % Methanol mehr zugefügt wurde.Die einzelnen Fraktionen wurden dc in System V untersucht.Es wurde eine Fraktion von 17 mg erhalten,in der die Acyl - Steringlykoside angereichert waren,und eine Fraktion von 19,9 mg,in der die Steringlykoside nach Umkristallisation aus Aceton dc rein vorlagen.

4.4.1. Gewinnung der Sterine,der Zucker- und der Fettsäurekomponente aus den Acyl - Steringlykosiden

Da die sc gewonnene Fraktion der Acyl - Steringlykoside dc nicht rein war,wurde sie an zwei Kieselgel 60 - Alufolien in System V präparativ gereinigt.Danach lagen 7 mg immer noch nicht vollständig reiner Substanz vor.Zum Nachweis der vermuteten Sterine,Fettsäuren und Zucker wurde die Substanz vier Stunden lang mit 20 ml einer 2 N wässrigen HCl am Rückfluss hydrolysiert.Nach Abkühlen wurde dreimal mit je 10 ml Petroläther ausgeschüttelt und so die Sterine und Fettsäuren von den Zuckern abgetrennt.Die Fettsäuren wurden durch viermaliges Ausschütteln der vereinigten Petrolätherphasen mit Na_2CO_3 - Lösung von den Sterinen abgetrennt,die Petrolätherphasen über Na_2SO_4 sicc. getrocknet, eingeengt und die Sterine gc untersucht.
Die in die Na_2CO_3 - Lösung übergegangenen Fettsäuren wurden wie unter IV.1.,S.148 f beschrieben behandelt und gc als Palmitinsäure identifiziert.
Zum Nachweis der Zucker wurde die von den Sterinen und Fettsäuren befreite saure Hydrolyseflüssigkeit durch Schütteln mit stark basischem Ionenaustauscher neutralisiert, filtriert,im Vakuum eingeengt und dc in System VI untersucht.

4.4.2. Gewinnung der Sterine und der Zuckerkomponente der Steringlykoside

10 mg der Steringlykosidfraktion wurden wie unter 4.4.1. beschrieben sauer hydrolysiert und das Hydrolysat nach Abkühlen dreimal mit je 15 ml Petroläther ausgeschüttelt.Ausbeute : 5,0 mg Sterine,die gc untersucht wurden.
Die von den Sterinen befreite Hydrolyseflüssigkeit wurde wie unter 4.4.1. angegeben bearbeitet und dc in System VI auf Zucker untersucht.

4.5. Quantitative Bestimmung der Sterine und Sterinderivate

4.5.1. Erstellung der Eichkurve

Die quantitative Bestimmung der Sterine und Sterinderivate im Callus erfolgte photometrisch nach der Methode von EICHENBERGER u. GROB (1970) bzw. WILLUHN u. KÖSTENS (1975) unter Verwendung der Farbreaktion mit LIEBERMANN - BURCHARD - Reagenz.Zur Aufstellung der Eichkurve wurden 10,0 mg des aus dem Callus isolierten Steringemisches in 1,00 ml Chloroform gelöst und von dieser Lösung jeweils 20 , 40 , 60 und 80 µl in 6 cm langen Streifen auf DC - Alufolien Kieselgel 60 F_{254} aufgetragen und in System II chromatographiert.Als Vergleichssubstanz lief in der Mitte der Platte Stigmasterin mit.Diese wurde nach Abdecken der übrigen Platte (s.präparative Schichtchromatographie,S. 158 f) mit LIEBERMANN -

BURCHARD - Reagenz sichtbar gemacht,sodass die entsprechende Sterinzone herausgeschnitten und mit Chloroform/Methanol (1 : 1) in ein 50 ml fassendes Kölbchen eluiert werden konnte.Für die Elution waren 25 - 30 ml Elutionsmittel ausreichend. Nach Eindampfen der Lösung wurde der Rückstand nacheinander mit 1,00 ml Eisessig,2,00 ml Essigsäureanhydrid und 0,1 ml konz. H_2SO_4 versetzt und die Lösung unter häufigem Umschütteln 30 Min. lang in einem thermostatisierten Wasserbad bei 24°C gehalten.Danach wurde die Extinktion der Lösung in 10 mm Schichtdicke bei 680 nm mit dem Spektralphotometer gemessen.Aus jeweils vier Bestimmungen wurde der Mittelwert berechnet und in einem Diagramm aufgezeichnet.Die so erhaltene Eichkurve ist in Abbildung 45 wiedergegeben.Die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert betrug 3 %.

4.5.2. Bestimmung der Gesamtsterine

20 g gemahlener Callus A wurden im Soxhlet drei Tage lang mit Aceton erschöpfend extrahiert.Der Rückstand des Acetonextraktes wurde in 50 ml Äthanol 96 %ig + 0,8 ml H_2SO_4 konz. gelöst und am Rückfluss 20 Stunden lang gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 30 ml einer 10 %igen äthanolischen KOH zugesetzt und weitere 30 Minuten lang zum Sieden erhitzt.Nach Erkalten wurde das Hydrolysat in einen Scheidetrichter überführt,50 ml Petroläther (40 - 60°C) und danach wenig Wasser zugesetzt,bis sich zwei Phasen bildeten. Die Petrolätherphase wurde abgetrennt und die wässrige Phase

noch dreimal sowie nach Zugabe von 20 ml Wasser noch zweimal mit je 50 ml Petroläther ausgeschüttelt.Die vereinigten Petrolätherauszüge wurden zweimal mit 20 ml 90 %igem Methanol gewaschen und dann im Vakuum zur Trockne gebracht.

Zur quantitativen Bestimmung wurde der Rückstand in 2,00 ml Chloroform gelöst und hiervon zweimal 0,01 ml und zweimal 0,02 ml wie bei der Erstellung der Eichkurve beschrieben chromatographiert,eluiert und mit dem Reagenz versetzt.Die erhaltenen Extinktionen (0,175 und 0,180 bzw. 0,349 und 0,333) wurden gemittelt,die Gehalte auf der Eichkurve abge-

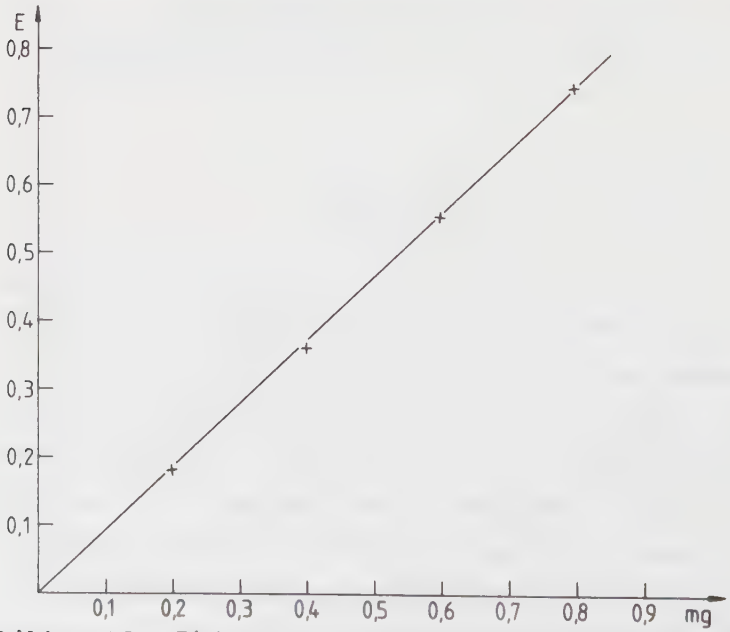


Abbildung 45 : Eichkurve zur quantitativen photometrischen Sterinbestimmung mit LIEBERMANN - BURCHARD - Reagenz

lesen und auf den Gehalt pro 100 g Callus umgerechnet.

4.5.3. Bestimmung der freien Sterine und Sterinester

20,0 g Callus wurden mit Petroläther erschöpfend extrahiert und der Trockenrückstand in 50 ml 95 %igem Äthanol + 30 ml einer 10 %igen äthanolischen KOH am Rückfluss 45 Minuten lang gekocht.Nach dem Erkalten wurde das Hydrolysat wie bei den Gesamtsterinen beschrieben mit Petroläther extrahiert. Der Rückstand wurde in 2,00 ml Chloroform gelöst und viermal 0,02 ml dieser Lösung zur quantitativen Bestimmung chromatographiert (E = 0,144 , 0,140 , 0,147 und 0,141).

4.5.4. Bestimmung der Sterinester

Der Rückstand des Petrolätherextraktes von 20,0 g Callus A wurde in 50 ml Äthanol abs. gelöst,zum Sieden erhitzt und mit 20 ml einer 2 %igen Digitoninlösung in 80 %igem Äthanol versetzt.Nach etwa einminütigem Kochen wurden 12 ml Wasser zugesetzt und die Mischung erneut kurz zum Sieden gebracht. Dieser Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank gehalten.Die ausgefallenen Sterin - Digitonide wurden anschliessend mit einer G 3 - Fritte abgetrennt,das Filtrat danach zur Trockne gebracht und der Rückstand mit 30 ml einer 10 %igen äthanolischen KOH 45 Minuten lang am Rückfluss gekocht.Die Aufarbeitung des Hydrolysates erfolgte wie zuvor angegeben.Der Rückstand wurde in 2,00 ml Chloroform gelöst und zweimal

0,1 sowie zweimal 0,2 ml hiervon für die quantitative Bestimmung chromatographiert (E = 0,081 und 0,086 bzw. 0,152 und 0,158).

4.6. Extraktion des Callus' zum dc Nachweis von Steroidalkaloiden und -sapogeninen

Die Aufarbeitung der Calli erfolgte nach den Angaben von VAGUJFALVI und Mitarb. (1971).Jeweils 10,0 g der gemahlenen Calli A,B,C und F (s.S. 53 f) wurden mit der zehnfachen Menge 70 %igem Methanol dreimal je eine Stunde lang auf dem Magnetrührer bei 65 - 70°C extrahiert und die methanolischen Auszüge jeweils über eine Nutsche abgetrennt.Die braune,trübe Flüssigkeit wurde zum Entfetten viermal mit je 100 ml Petroläther ausgeschüttelt.Die Rückstäande der über Na_2SO_4 sicc. getrockneten Petrolätherauszüge (s.Tab. 10) wurden zur Isolierung der freien Sterine herangezogen.

Die entfetteten Methanolauszüge wurden im Vakuum zur Trockne gebracht (Rückstände s.Tab. 10).Dabei schäumte der Extrakt von Callus F stark.Die Rückstände wurden in 150 ml Äthanol 96 %ig + 150 ml 1 N H_2SO_4 gelöst und 6 Stunden lang am Rückfluss hydrolysiert.Nach dem Erkalten wurden die Hydrolysate mit konz. Ammoniaklösung auf pH 9 gebracht und zweimal mit 300 ml sowie einmal mit 200 ml Chloroform ausgeschüttelt.Für die dc Analysen wurden von den Chloroform-

rückständen (s.Tab. 10) 5 %ige Lösungen in Chloroform hergestellt.

Tabelle 10 : Bei den einzelnen Arbeitsgängen aus jeweils 10 g Callus erzielte Rückstände

Callus	Rückstände in g		
	Petroläther-Ausschüttelung	entfetteter Methanolauszug	$CHCl_3$-Auszug nach Hydrolyse
A	0,041	3,92	0,50
B	0,046	4,85	0,77
C	0,044	3,53	0,44
F	0,052	3,88	0,51

5. Gewinnung der Fettsäuren aus dem Petrolätherextrakt des Samens

5.1. Gewinnung der frei vorliegenden Fettsäuren

Die frei vorliegenden Fettsäuren wurden aus 100 g des aus dem Samen gewonnenen Petrolätherextraktes (s.S. 169) isoliert. Der Petrolätherextrakt wurde viermal mit je 200 ml einer 10 %igen wässrigen Na_2CO_3 - Lösung ausgeschüttelt.Nach Ansäuern der sodaalkalischen Lösung mit 10 %iger HCl wurden die freigesetzten Fettsäuren mit Petroläther (40 - 60°C) ausgezogen,die Petroläther - Ausschüttelung über Na_2SO_4 sicc.

getrocknet,filtriert und im Vakuum zur Trockne gebracht. Als Rückstand verblieben 7,8 g freie Fettsäuren von flüssiger Konsistenz sowie 91 g entfetteter Petrolätherextrakt.

5.2. Gewinnung der gebunden vorliegenden Fettsäuren

Die gebunden vorliegenden Fettsäuren wurden aus dem Hydrolysat des von freien Fettsäuren befreiten Petrolätherextraktes (s. 5.1.) isoliert.Nach Ansäuern eines Teiles des alkalischen,bereits mit Petroläther ausgeschüttelten Verseifungsansatzes mit 10 %iger HCl wurden die freigesetzten säuren durch fünfmaliges Ausschütteln mit insgesamt 240 ml Petroläther (40 - 60°C) abgetrennt.Die Petrolätherphasen wurden über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und das Lösungsmittel schonend im Vakuum bei Zimmertemperatur abgezogen.Ausbeute : 1,80 g Fettsäuren.

5.3. Bildung der Hg(II) - acetat - Addukte

100 mg der frei bzw. 250 mg der in Estern vorliegenden Fettsäuren wurden nach ihrer Überführung in die Methylester nach JANTZEN u. ANDREAS (1959) in einer Mischung von 1,4 (3,5) g Hg(II) - acetat,25,0 (62,5) ml Methanol,0,25 (0,63) ml H_2O und 0,1 (0,25) ml Eisessig gelöst und 24 Std. lang im Dunkeln stehen gelassen.Nach Abziehen des Lösungsmittels im

Vakuum wurde der Rückstand in 17,5 (43,8) ml Chloroform suspendiert.Überschüssiges Hg(II) - acetat wurde durch fünfmaliges Ausschütteln mit je 5 (12,5) ml Wasser entfernt und die über Na_2SO_4 sicc. getrocknete Chloroformphase im Vakuum eingedampft.

5.4. Spaltung der Hg(II) - acetat - Addukte

Diese Adduktspaltung erfolgte nach GLASER und Mitarb. (1962). Hierbei wurden die einzelnen Adduktzonen ohne Abtrennung vom Adsorbens zu 7,5 (freie Fettsäuremethylester) bzw. 9,4 (Gesamtfraktion der gebundenen Fettsäuremethylester) und 3,1 ml (Monoen-,Dien- und Trienzone) einer Lösung von 5 % Ammoniumthiocyanat in Methanol und 1,0 , 1,25 und 0,4 ml konz. HCl gegeben und unter mehrmaligem Umschütteln eine Stunde lang im Dunkel stehengelassen.Nach Zusatz von 37,5 , 46,9 und 15,6 ml Wasser wurden die Ansätze dreimal mit je 12,5 , 15,5 und 5,2 ml Petroläther (40 - 60°C) ausgeschüttelt und nach Abziehen des getrockneten Lösungsmittels die jeweilige Fraktion ungesättigter Fettsäuremethylester erhalten.Anschliessend wurden die Fraktionen gc untersucht.

6. Gewinnung der Fettsäuren aus dem Petrolätherextrakt des Callus'

6.1. Gewinnung der frei vorliegenden Fettsäuren

Die frei vorliegenden Fettsäuren wurden wie unter 5.1. beschrieben aus 5,6 g Petrolätherextrakt durch Ausschütteln mit Na_2CO_3 - Lösung,ansäuern und erneutes Ausschütteln mit Petroläther erhalten.Ausbeute : 0,17 g freie Fettsäuren von halbflüssiger Konsistenz (≙ 0,06 % vom Callustrockengewicht).

6.2. Gewinnung der gebunden vorliegenden Fettsäuren

5,4 g von freien Fettsäuren befreiter Petrolätherextrakt wurden wie unter 5.2. beschrieben hydrolysiert,das Hydrolysat nach Ausschütteln mit Petroläther angesäuert und die aus ihren Salzen freigesetzten Fettsäuren wie unter 5.2. beschrieben mit Petroläther ausgeschüttelt.Ausbeute 1,78 g Fettsäuren (≙ 0,59 % vom Callustrockengewicht).

F. Literaturverzeichnis

ALFERMANN,A.W.,H.M. BOY,P.C. DÖLLER,W. HAGEDORN,M. MEINS J. WAHL und E. REINHARD : Biotransformation o cardiac glycosides by plant cell cultures Plant tissue culture and its bio - technica application;Proc. Int. Congr. 1st 1976, pp. 125 - 141

ALFERMANN,A.W.,D. MERZ und E. REINHARD : Induktion de Anthocyanbiosynthese in Calluskulturen vor Daucus carota Planta med. Suppl. 1975 , 70 - 78

BABCOCK,Ph.A. und D.P. CAREW : Tissue culture of the Apo- cynaceae.I. Culture requirements and alkaloid analysis Lloydia 25 , 209 - 213 (1962)

BARZ,W. : Abbau von aromatischen und heterozyklischen Pflan zeninhaltsstoffen durch Zellsuspensionskulturer Planta med. Suppl. 1975 , 117 - 133

BARZ,W. und W. HÖSEL : Metabolism of flavonoids in : MABRY,MABRY and HARBONE (eds.) : The Flavo- noids,Chapman and Hall Ltd 1975 , pp. 918 - 969

BECKER,H. : Stoffproduktion in pflanzlichen Callus- und Organkulturen Mitt. Archiv d. Pharmazie 39 , 273 - 279 (1969

BECKER,H. : Untersuchungen zur Frage der Bildung flüchtiger Stoffwechselprodukte in Calluskulturen Biochem.Physiol.Pflanzen 161 , 425 - 441 (1970)

BEDOUR,M.S.,D. EL-MUNAJJED,M.B.E. FAYEZ und A.N. GIRGIS : Steroid sapogenins.VII.Identification and origin of 25 D - spirosta - 3,5 - diene among the fenugreek sapogenins
J. Pharm. Sci. 53 , 1276 - 1278 (1964)

BENVENISTE,P. : La biosynthèse des stérols dans les tissus de tabac cultivés in vitro.Mise en évidence du cycloeucalénol et de l'obtusifoliol
Phytochemistry 7 , 951 - 953 (1968)

BENVENISTE,P.,J.J.E. HEWLINS und B. FRITIG : La biosynthèse des stérols dans les tissus de tabac cultivés in vitro.Cinétique de formation des stérols et de leurs précurseurs
European J. Biochem. 9 , 526 - 533 (1969)

BENVENISTE,P.,L. HIRTH und G. OURISSON : La biosynthèse des stérols dans les tissus de tabac cultivés in vitro.I.Isolement de stérols et de triterpenes
Phytochemistry 5 , 31 - 44 (1966 a)

BENVENISTE,P.,L. HIRTH und G. OURISSON : La biosynthèse des stérols dans les tissus de tabac cultivés in vitro.II.Particularités de la biosynthèse des phytostérols des tissus de tabac cultivés in vitro
Phytochemistry 5 , 45 - 58 (1966 b)

BLUNDEN,G. und R. HARDMAN : Steroidal constituents of Yucca glauca
Phytochemistry 8 , 1523 - 1531 (1969)

BÖHM,H. : Secundary metabolism in cell cultures of higher plants and problems of differentiation
in : LUCKNER,M.,L. NOVER und H. BÖHM : Secondary

metabolism and cell differentiation,pp. 103 - 123
Springer Verlag Berlin.Heidelberg,New York 1977

BOLL,P.M. und B. ANDERSEN : Alkaloidal glycosides from Solanum dulcamara III.Differentiation of geographical strains by means of thin - layer chromatography
Planta med. 10 , 421 - 432 (1962)

BOWLES,D.J.,L.LEHLE und H. KAUSS : Glucosylation of sterols and polyprenolphosphate in the Golgi - apparatus of Phaseolus aureus
Planta 134 , 177 - 181 (1977)

BOY,H.M. : Umwandlung von Herzglykosiden,Digitoxigenin und Digitoxigenin - Derivaten durch Zellkulturen von Digitalis lanata
Dissertation,Tübingen 1975

v.BROCKE,W. : Ruta graveolensL..Zur Kenntnis,Analytik und Bildungsphysiologie der Cumarine in Gewebekulturen
Dissertation,Tübingen 1972

BÜCHNER,S.A. und E.J. STABA : Digitalis tissue cultures for cardenolides
J. Pharm. Pharmacol. 16 , 733 - 737 (1964)

BUI-DANG-HA,D. und I.A. MACKENZIE : The division of protoplasts from Asparagus officinalis L. and their growth and differentiation
Protoplasma 78 , 215 - 221 (1973)

BUTCHER,D.N. : Secondary products in tissue cultures
in : REINERT,J. und Y.P.S. BAJAJ (eds.) : Applied and fundamental aspects of plant cell,tissue, and organ culture
Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1977

BUTENKO,R.G. : Plant tissue culture and plant morphogenesis
Clearinghouse for Federal Scientific and Technical Information 1968

CAREW,D.P. : Growth of callus tissue of Catharanthus roseus in suspension culture
J. Pharm. Sci. 55 , 1153 - 1154 (1966)

CAREW,D.P. and E.J. STABA : Plant tissue culture : its fundamentals,application and relationship to medicinal plant studies
Lloydia 28 , 1 - 26 (1965)

CORDUAN,G. und E. REINHARD : Synthesis of volatile oils in tissue cultures of Ruta graveolens
Phytochemistry 11 , 917 - 922 (1972)

COWLEY,P.S. und F.C. EVANS : Variation in the amounts of glycoside and lipid phytosterols in Digitalis purpurea during germination
J. Pharm. Pharmacol. 22 , 88 - 92 (1970)

CZYGAN,F.C. : Möglichkeiten zur Produktion von Arzneistoffen durch pflanzliche Gewebekulturen
Planta med. Suppl. 1975 , 169 - 185

CZYGAN,F.C. : Pflanzliche Gewebekulturen als Objekte pharmazeutisch - biologischer Forschung
ÖAZ 20 , 461 - 466 (1976)

DANERT,S. : Infragenetische Taxa der Gattung Solanum L.
Kulturpflanze 18 , 253 - 297 (1970)

DAWIDAR,A.M.,A.A. SALEH und S.L. ELMOTEI : Steroid sapogenin constituents of Fenugreek seeds
Planta med. 24 , 367 - 370 (1973)

DIBBERN,H.W.,D. OTT und E. WIRBITZKI : Quantitative Dünnschichtchromatographie mit einfachen Mitteln
Dtsch. Apoth. Ztg. 111 , 1649 - 1651 (1971)

DÖLLER,G.,A.W. ALFERMANN und E. REINHARD : Produktion von Indolalkaloiden in Calluskulturen von Catharanthus roseus
Planta med. 30 , 14 - 20 (1976)

DORION,N.,Y. CHUPEAU und J.P. BOURGIN : Isolation and regeneration into plants of Ranunculus sceleratus L. leaf protoplasts
Plant Sci. Letters 5 , 325 - 331 (1975)

DRAGALIN,I.P. und P.K. KINTYA : Steroidal saponins of Yucca filamentosa : Yuccoside C and Protoyuccoside C
Phytochemistry 14 , 1817 - 1820 (1975)

DURAND,J.,I. POTRYKUS und G. DONN : Plantes issues de protoplastes de Pétunia
Z. Pflanzenphysiol. 69 , 26 - 34 (1973)

EDDY,C.R.,M.E. WALL und M.E. KLUMPP SCOTT : Catalogue of infrared absorption spectra of steroidal sapogenin acetats
Analyt. Chem. 25 , 266 - 271 (1953)

EICHENBERGER,W. : Sterylglycosides and acetylated sterylglycosides
in : TEVINI,M. und H.K. LICHTENTHALER (eds.) : Lipids and lipid polymers in higher plants,p.169
Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1977

EICHENBERGER,W. und E.C. GROB : Über die quantitative Bestimmung von Sterinderivaten in Pflanzen und die intrazelluläre Verteilung der Steringlyko-

side in Blättern
FEBS Letters 11 , 177 - 180 (1970)

EVANS,F.J. : Sterylesters of Digitalis purpurea L. herb.
J. Pharm. Pharmacol. 25 , 156 - 163 (1973)

FORSEE,W.T.,R.A. LAINE und A.D. ELBEIN : Solubilization of particulate UDP - glucose sterol β - glucosyl-transferase in developing cotton fibers and seeds and characterization of steryl 6 - acyl - D - glucosides
Arch. Biochem. Biophys. 161 , 248 - 259 (1974)

FURUYA,T.,A. IKUTA und K. SYONO : Alkaloids from callus tissue of Papaver somniferum
Phytochemistry 11 , 3041 - 3044 (1972)

FURUYA,T.,H. KOJIMA und K. SYONO : Regulation of nicotine synthesis in tobacco callus tissue
Chem. Pharm. Bull. 15 , 901 - 903 (1967)

GAUTHERET,R.J. : Culture du tissu cambial
C. R. hébd. Séances Acad. Sci. 198 , 2195 - 2196 (1934)

GAUTHERET,R. J. : Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte
C.R. hébd. Séances Acad. Sci. 208 , 118 - 120 (1939)

GAUTHERET,R.J. : La culture des tissus végétaux
Masson & Cie,Paris 1959

GEIER,T. und H.W. KOHLENBACH : Entwicklung von Embryonen und embryogenem Callus aus Pollenkörnern von Datura meteloides und Datura innoxia
Protoplasma 78 , 381 - 396 (1973)

GLASER,A.,A. GRIMMER,E. JANTZEN und H. OERTEL : Eine Methode zur Bestimmung der Fettsäuren des Humanblutes unter besonderer Berücksichtigung der in geringen Mengen vorkommenden Fettsäuren
Biochem. Z. 336 , 274 - 280 (1962)

GOAD,L.J.,I.R. LENTON,F.F. KNAPP und T.W. GOODWIN : Phytosterol side chain biosynthesis
Lipids 9 , 582 - 595 (1974)

GRAMBOW,H.J.,K.N. KAO,R.A. MILLER und O.L. GAMBORG : Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures
Planta 103 , 348 - 355 (1972)

GRAVES,I.M.H. und W.K. SMITH : Transformation of pregnenolone and progesterone by plant cells
Nature 214 , 1248 - 1249 (1967)

GROB,E.C. und W. EICHENBERGER : Galactolipids and fatty acids in normal and glucose - stimulated Spirodela oligorrhiza cultures
FEBS Letters 5 , 335 - 337 (1969)

GRÜTZMANN,K.D. : Über Zell- und Gewebekulturen
Die Pharmazie 21 , 340 - 345 (1966)

GRUNWALD,C. : Plant sterols
Ann. Rev. Plant Physiol. 26 , 209 - 236 (1975)

HABERLANDT,G. : Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen
Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien,Math. Nat. Classe 111 , Abt. 1,69 - 92 (1902)

HARTMANN,M.A.,P. FONTENEAU und P. BENVENISTE : Subcellular

localization of sterol synthesizing enzymes in maize coleoptiles
Plant Sci. Letters 8 , 45 - 51 (1977)

HARTMANN,M.A.,G. NORMAND und P. BENVENISTE : Sterol composition of plasma membrane enriched fractions from maize coleoptiles
Plant Sci. Letters 5 , 287 - 292 (1975)

HARTMANN - BOUILLON,M.A. und P. BENVENISTE : Sterol biosynthetic capability of purified membrane fractions from maize coleoptiles
Phytochemistry 17 , 1037 - 10 42 (1978)

HEBLE,M.R.,S. NARAYANASWAMI und M.S. CHADHA : Solasonine in tissue cultures of Solanum xanthocarpum
Naturwissenschaften 55 , 350 - 351 (1968 a)

HEBLE,M.R.,S. NARAYANASWAMI und M.S. CHADHA : Diosgenin and β - sitosterol : Isolation from Solanum xanthocarpum tissue cultures
Science 161 , 1145 (1968 b)

HEBLE,M.R.,S. NARAYANASWAMI und M.S. CHADHA : Hormonal control of steroid synthesis in Solanum xanthocarpum tissue cultures
Phytochemistry 10 , 2393 - 2394 (1971 a)

HEBLE,M.R.,S. NARAYANASWAMI und M.S. CHADHA : 24 - Methylenecholesterol in tissue cultures of Holarrhena antidysenterica
Z. Naturforsch. 26 b , 1382 (1971 b)

HEBLE,M.R.,S. NARAYANASWAMI und M.R. CHADHA : Studies on growth and steroid formation in tissue cultures of Holarrhena antidysenterica

Phytochemistry 15 , 681 - 682 (1976)

HEGI,G. : Illustrierte Flora von Mitteleuropa,Bd.V,4. Teil, S. 2589,München 19 7

HEGNAUER,R. : Chemotaxonomie der Pflanzen;Bd. V (1972) Birkhäuser Verlag Basel,Stuttgart

HEINTZ,R. und P. BENVENISTE : Plant sterol metabolism:enzymatic cleavage of the 9β,19β - cyclopropane ring of cyclopropyl sterols in bramble tissue cultures
J. Biol. Chem. 249 , 4267 - 4274 (1974)

HEWLINS,M.J.E.,J.D. EHRHARDT,L. HIRTH und G. OURISSON The conversion of ^{14}C - Cycloartenol and ^{14}C - Lanosterol into phytosterols by culture of Nicotiana tabacum
Europ. J. Biochem. 8 , 184 - 188 (1969)

HILDEBRANDT,A.C.,A.J. RIKER und B.M. DUGGAR : The influence of the composition of the medium on the growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue cultures
Amer. J. Bot. 33 , 591 - 597 (1946)

HOMBERG,E.E. : Die Zusammensetzung der Samen und Schoten von Sommerraps "Erglu" während der Reifung
Phytochemistry 15 1361 - 1365 (1976)

IDLER,D.R.,S.W. NICKSIC.D.R. JOHNSON,V.W. MELOCHE,H.A. SCHNETTE und C.A. BAUMANN : Separation and tentative identification of two new sterols from oats
J. Amer. Chem. Soc. 75 , 1712 - 1715 (1953)

ITOH,T.,T. ISHII,T.TAMURA und T. MATSUMOTO : Four new and other 4α - methylsterols in the seeds of Solanaceae
Phytochemistry 17 , 971 - 977 (1978)

ITOH,T.,T. TAMURA und T. MATSUMOTO : Sterol composition of 19 vegetable oils
J. Amer. Oil Chem. Soc. 50 , 122 - 125 (1973)

ITOH,T.,T. TAMURA und T. MATSUMOTO : 4 - desmethylsterols in the seeds of Solanaceae
Steroids 30 , 425 - 433 (1977 a)

ITOH,T.,T. TAMURA und T. MATSUMOTO : Triterpene alcohols in the seeds of Solanaceae
Phytochemistry 16 , 1723 - 1726 (1977 b)

ITOKAWA,H.,M. AKASU und M. FUIJITA : Several oxidized sterols isolated from callus tissue of Stephania cepharantha
Chem. Pharm. Bull. 21 , 1386 - 1387 (1973)

JANTZEN,E. und H. ANDREAS : Reaktion ungesättigter Fettsäuren mit Quecksilber(II) - acetat,Anwendung für präparative Trennungen I.
Chem. Ber. 92 , 1427 - 1437 (1959)

JEONG,T.M.,T. ITOH,T. TAMURA und T. MATSUMOTO : Analysis of sterol fractions from twenty vegetable oils
Lipids 9 , 921 - 927 (1974)

JOHNSON,J.L.,M.F. GROSTIC und A.O. JENSEN : Determination of stigmasterol in soybean sterol mixtures by infrared method
Anal. Chem. 29 , 468 - 470 (1957)

JOLY,R.A.,J. BONNER,R.D. BENNETT und E. HEFTMANN : Conversion of cholesterol to an open - chain saponin by Dioscorea floribunda
Phytochemistry 8 , 857 - 859 (1969)

KAO,K.N. und M.R. MICHAYLUK : Nutritional requirements for growth of Vicia hajastana cells and protoplasts at a very low population density in liquid media
Planta 126 , 105 - 110 (1975)

KARTHA,K.K.,M.R. MICHAYLUK,K.N. KAO,O.L. GAMBORG und F. CONSTABEL : Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (Brassica napus L. cv. Zephyr)
Plant Sci. Letters 3 , 265 - 271 (1974)

KARTNIG,T. : Cardiac glycosides in cell cultures of Digitalis in : BARZ,W.,E. REINHARD und M.H. ZENK : Plant tissue culture and its bio - technical application,pp. 44 - 51 (1977)
Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York

KARTNIG,T. und P. KOBOSIL : Observations on the occurence and the formation of cardenolides in tissue cultures of Digitalis purpurea and Digitalis lanata.2. Cardenolides in submerse cultures of the leaves of Digitalis purpurea
Planta med. 31 , 221 - 227 (1977)

KARTNIG,T.,U. RUSSHEIM und B. MAUNZ : Beobachtungen über das Vorkommen und die Bildung von Cardenoliden in Gewebekulturen aus Digitalis purpurea und Digitalis lanata.1. Cardenolide in Oberflächenkulturen aus Keim- und Laubblättern von Digitalis purpurea
Planta med. 29 , 275 - 288 (1976)

KATING,H.,W. RINN und G. WILLUHN : Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica - Arten.III. Die Fettsäuren in den ätherischen Ölen der Blüten verschiedener Arnica - Arten
Planta med. 13 , 130 - 146 (1970)

KAUL,B. und E.J. STABA : Dioscorea tissue cultures.I. Biosynthesis and isolation of diosgenin from Dioscorea deltoidea callus and suspension cultures
Lloydia 31 , 171 - 179 (1968)

KAUL,B.,S.J. STOHS und E.J. STABA : Dioscorea tissue cultures.III.Influence of various factors on diosgenin production by Dioscorea deltoidea callus and suspension cultures
Lloydia 32 , 347 - 359 (1969)

KAUL,B.,P. WELLS und E.J.STABA : Production of cardioactive substances by plant tissue cultures and their screening for cardiovascular activity
J. Pharm. Pharmacol. 19 , 760 - 766 (1967)

KHANNA,P. und S.C. JAIN : Diosgenin,gitogenin and tigogenin from Trigonella foenum - graecum tissue cultures
Lloydia 36 , 96 - 98 (1973)

KHANNA,P. und S. MOHAN : Isolation and identification of diosgenin and sterols from fruits and in vitro cultures of Momordica charantia L.
Indian J. Exp. Biol. 11 , 58 - 60 (1973)

KIYOSAWA,S.,M. HUTOH,T. KOMORI,T. NOHARA,T. KAWASAKI und I. HOSOKAWA : Detection of proto - type compounds of diosgenin and other spirostanol - glycosides

Chem. Pharm. Bull. 16 , 1162 - 1164 (1968)

KNIGHTS,B.A. : Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry
J. of G.C. 5 , 273 - 282 (1967)

KOBLITZ,H. : Zell- und Gewebezüchtung bei Pflanzen
Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1972

KOBLITZ,H.,K. GRÜTZMANN und J. HAGEN : Gewebekulturen aus Alkaloidpflanzen.I. Papaver somniferum L.
Z. Pflanzenphysiol. 56 , 27 - 32 (1967)

KÖSTENS,J. : Die Triterpenoide,Sterine und Sterinderivate von Solanum dulcamara L.
Dissertation,Marburg 1973

KÖSTENS,J. und G. WILLUHN : Steringlykoside und Acyl - Steringlykoside in Blättern von Solanum dulcamara
Planta med. 24 , 278 - 285 (1973)

KOHLENBACH,H.W. : Streckungs- und Teilungswachstum isolierter Mesophyllzellen von Macleya cordata (Willd.) R. Br.
Naturwissenschaften 46 , 116 - 117 (1959)

KOHLENBACH,H.W. : Nucleoli mit "pulsierenden Vakuolen" bei kultuvierten Rhoeo - Epidermiszellen
Z. Pflanzenphysiol. 58 , 187 - 190 (1967 a)

KOHLENBACH,H.W. : Die Entwicklungspotenzen explantierter und isolierter Dauerzellen.III. Das histogene Differenzierungswachstum bei Macleya cardata - Calli
Beitr. Biol. Pflanzen 43 , 357 - 365 (1967 b)

KRSTIC - PAVLOVIC,N. und M. MIRIC : La semence et l'huile grasse des semences de Solanum laciniatum Ait.
Acta Pharm. Jugoslav. 22 , 49 - 53 (1972)

KUHN,R. und I. LÖW : Über Demissin, ein Alkaloidglykosid aus den Blättern von Solanum demissum
Chem. Ber. 80 , 406 - 410 (1947)

LEE,F.K.,D.P. CAREW und J. ROSALZA : Apocynum cannabinum tissue cultures.Growth and chemical analysis
Lloydia 35 , 150 - 156 (1972)

LEE,T.T. und A.N. STARPATT : Growth substance requirements and major lipid constituents of tissue cultures of Euphorbia esula and E. cyparissias
Can. J. Bot. 50 , 723 - 726 (1972)

LINSMAIER,E. and F. SKOOG : Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures
Physiol. Plant. 18 , 100 - 127 (1965)

MANGOLD,H.K. : The common and unusual lipids of plant cell cultures
in : BARZ,W.,E. REINHARD und M.H. ZENK (eds.) : Plant tissue culture and its bio - technical applications , pp. 55 - 65 (1977)
Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York

MANGOLD,H.K. und R. KAMMERECK : Separation,identification and qualitative analysis of fatty acids by thin - layer chromatography and gas - liquid chromatography
Chem. and Ind. (London) 1032 - 1034 (1961)

MANNING,C.E.F. : The market for steroid drug precursors

with particular reference to diosgenin
Trop. Prod. Inst. Rep. No. G 41, 11 (1969)

MARSHALL,J.G. und E.J. STABA : Steroids and an artifact from Dioscorea deltoidea tissue cultures
Lloydia 39 , 84 - 85 (1976 a)

MARSHALL,J.G. und E.J. STABA : Hormonal effects on diosgenin biosynthesis and growth in Dioscorea deltoidea tissue cultures
Phytochemistry 15 , 53 - 56 (1976 b)

MATHE,I. und I. MATHE : Steroids of Solanum dulcamara L. and their variability
Herb. Hung. 17 , 39 - 55 (1978)

MATHES,M.C. : The in vitro growth of Acer saccharum and Acer pennsylvanicum callus tissue
Can. J. Bot. 45 , 2195 - 2200 (1967)

MURASHIGE,T. : Analysis of the inhibition of organ formation in tobacco tissue culture by gibberellin
Physiol. Plant. 17 , 636 - 643 (1964)

MURASHIGE,T. : Effects of stem elongation retardants and gibberellin on callus growth and organ formation in tobacco tissue culture
Physiol. Plant. 18 , 665 - 673 (1965)

MATSUO,A.,N. NAKAYAMA,S. HAYASHI und S. NISHIMOTO : Isolation of n - paraffins and sec - alcohols from Isotachis japonica
Phytochemistry 11 , 3313 - 3316 (1972)

MEANCE,J.,P. DUPERON und R. DUPERON : Repartition des substances stéroliques à l'inférieur des mitochondries

de l'inflorescence de chou - fleur
Physiol. Vég. 14 , 745 - 756 (1976)

MEDORA,R.S.,D.C. KOSEGARTEN,D.P.N. TSAO und J.J. De FEO : Cardiotonic activity in callus tissue of Digitalis mertonensis
J. Pharm. Sci. 56 , 540 - 541 (1967 b)

MEDORA,R.S.,D.P.N. TSAO und L.S. ALBERT : Tissue culture of Digitalis mertonensis.I. Effect of certain steroids on the callus growth and formation of Baljet positive substances in D. mertonensis
J. Pharm. Sci. 56 , 67 - 72 (1967 a)

MEHTA,A.R. und E.J. STABA : Presence of diosgenin in tissue cultures of Dioscorea composita Hemsl. and related species
J. Pharm. Sci. 59 , 864 - 865 (1970)

MELCHERS,G. : Genetik und Pflanzenzüchtung mit mikrobiologischen Methoden
Planta med. Suppl. 1975 , 5 - 34

METZ,H. : Pflanzliche Zellkulturen als Naturstoffproduzenten in : Forschung aktuell : Biotechnologie;Hrsg. : Der Bundesminister für Forschung und Technologie
Umschau - Verlag Frankfurt a.M. 1978

MOREL,G. : Action de l'acide pantothénique sur la croissance des tissus d'Aubépine cultivés in vitro
C.R. hébd. Séances Acad. Sci. 223 , 166 - 168 (1946)

MOSSNER,U. und F.C. CZYGAN : Gewebekulturen und ihre Bedeutung für die Züchtung und Kultivierung von Arzneipflanzen
Acta Hort. 73 , 47 - 57 (1978)

MURASHIGE,T. und F. SKOOG : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures
Physiol. Plant. 15 , 473 - 497 (1962)

MURASHIGE,T. : Plant propagation through tissue cultures
Ann. Rev. Plant Physiol. 25 , 135 - 166 (1974)

NAGEL,M. : Das ätherische Öl der Calluskulturen von Ruta graveolens L.
Dissertation,Tübingen 1974

NES,W.R. : Role of sterols in membranes
Lipids 9 , 596 - 612 (1974)

NETIEN,G. : Action de la gibberelline sur différents types de tissus végétaux cultivés in vitro
Compt. Rend. 247 , 1645 - 1647 (1958)

NETIEN,G.,F. KOZJEK und M.C. FAVRE : Culture in vitro de tissu de tiges de Peripicca graeca L.
Compt. Rend. Soc. Biol. 155 , 1718 (1967)

NETIEN,G. und J. LACHARME : Culture in vitro de tissu de tiges de Vincetoxicum officinale Moench.
Compt. Rend. Soc. Biol. 159 , 1724 (1965)

NITSCH,J.P. und C. NITSCH : Haploid plants from pollen grains
Science 163 , 85 - 87 (1969)

NOBECOURT,P. : Cultures en série de tissus végétaux sur milieu artificiel
C.R. hébd. Séances Acad. Sci. 205 , 521 - 523 (1937)

PEAL,W.J. : Dehydratation of diosgenin during the acid hydrolysis of Dioscorea saponins
Chem. Ind. (London) 1451 - 1452 (1957)

PETIARD,V. und Y. DEMARLY : Mise en évidence de glucosides et d'alcaloides dans les cultures de tissus végétaux
Ann. Amelior. Plantes 22 , 375 - 387 (1972)

PILGRIM,H. : "Cholesterol side - chain cleaving enzyme" Aktivität in Keimlingen und in vitro kultivierten Geweben von Digitalis purpurea
Phytochemistry 11 , 1725 - 1728 (1972)

PUHAN,Z. und S.M. MARTIN : The industrial potential of plant cell culture
Progr. Ind. Microbiol. 9 , 13 - 29 (1971)

PURI,R.K. und J.K.BHATNAGAR : Study of the seed oil of Solanum platanifolium SIMS
J. Am. Oil Chem. Soc. 53 , 168 (1976)

QUAK,F. : Meristem culture and virus - free plants
in : REINERT,J. und Y.P.S. BAJAJ (eds.) : Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue,and organ culture,pp. 598 - 615 (1977)
Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York

RADWAN,S.S. und H.K. MANGOLD : Lipids in plant tissue cultures.V. Effect of environmental conditions on the lipids of Glycine soja and Brassica napus cultures
Chem. Phys. Lipids 14 , 87 - 91 (1975)

RADWAN,S.S. und H.K. MANGOLD : The lipids of plant tissue cultures
Adv. Lipid Res. 14 , 171 - 211 (1976)

RADWAN,S.S.,H.K. MANGOLD und F. SPENER : Lipids in plant tissue cultures.III. Very long - chain fatty acids in the lipids of callus cultures and suspension cultures

Chem. Phys. Lipids 13 , 103 - 107 (1974)

RADWAN,S.S.,F. SPENER und H.K. MANGOLD : Lipids in plant tissue cultures.IV. The characteristic patterns of lipid classes in callus cultures and suspension cultures
Chem. Phys. Lipids 14 , 72 - 80 (1975)

REHM,K. : Untersuchungen zur Analytik und über das Vorkommen von Hydroxyfettsäuren im Pflanzenreich
Dissertation,München 1967

REINHARD,E. : Probleme der Produktion von Arzneistoffen durch pflanzliche Gewebekulturen
Dt. Apoth. Ztg. 107 , 1201 - 1207 (1967)

REINHARD,E. : Biotransformation by plant tissue cultures
in : STREET,H.E. (ed.) : Tissue culture and plant science,pp. 433 - 459 (1974)
Academic Press London,New York,San Francisco

REINHARD,E. : Möglichkeiten der Verwendung von Gewebekulturen in der Arzneipflanzenforschung
Planta med. Suppl. 1975, 1 - 4

REINHARD,E.,H.M. BOY und F. KAISER : Umwandlungen von Digitalisglykosiden durch Zellsuspensionskulturen
Planta med. Suppl. 1975, 163 - 168

REINHARD,E.,G. CORDUAN und O.H. VOLK : Über Gewebekulturen von Ruta graveolens
Planta med. 16 , 8 - 16 (1968)

REUTHER,G. : Induktion der Embryogenese in Calluskulturen
Planta med. Suppl. 1975 , 42 - 58

REUTHER,G. : Pflanzenvermehrung der Zukunft
Dt. Gärtnerbörse 77 , 137 - 139 (1977)

RODDICK,J.G. und D.N. BUTCHER : Tomatine production in cultured excised tomato roots
Phytochemistry 11 , 2991 - 2998 (1972)

RÖNSCH,H. und K. SCHREIBER : Solanum - Alkaloide LXV.Über vier neue 15α - Hydroxy - spirosolan - Alkaloide aus Wurzeln von Solanum dulcamara L.
Liebigs Ann. Chem. 694 , 169 - 182 (1966 a)

Rönsch,H. und K. SCHREIBER : Solanum - Alkaloide LXXXIII. Analytische und präparative dünnschichtchromatographische Trennung von 5α - gesättigten bzw. Δ^5 - ungesättigten Steroidalkaloiden und -sapogeninen an $AgNO_3$ - haltigen Adsorptionsschichten
J. Chromatog. 30 , 149 - 154 (1967)

RÖNSCH,H.,K. SCHREIBER und H. STUBBE : Isolierung von Tomatidin aus Bittersüssem Nachtschatten
Naturwissenschaften 55 , 182 (1968)

SANDER,H. : Isolierung von Diosgenin und Gitogenin aus Solanum sodomaeum L.
Naturwissenschaften 48 , 303 - 304 (1961)

SANDER,H. : Chemische Rassen bei Solanum dulcamara;zur Chemotaxonomie der Gattung Solanum (sensu ampl.)
Englers Botan. Jahrb. 82 , 404 - 428 (1963 a)

SANDER,H. : Chemische Differenzierung innerhalb der Art Solanum dulcamara L.
Planta med. 11 , 303 - 316 (1963 a)

SANDER,H. : Über Solanum dulcamara L..7. Mitt.:Abbau von

Spirosolanolglykosiden in reifenden Früchten
Planta med. 11 , 23 - 36 (1963 c)

SANDER,H. und G. WILLUHN : Über Solanum dulcamara L..5.Mitt. : Isolierung von Tigogenin neben Soladulcidin aus reproduktiven Organen
Flora 151 , 150 - 154 (1961)

SANGWAN,R.S. und H. HARADA : Chemical factors controlling morphogenesis of Petunia cells cultured in vitro
Biochem. Physiol. Pflanzen 170 , 77 - 84 (1976)

SATO,H. und S. SAKAMURA : A bitter principle of tomato seeds;isolation and structure of a new furostanol saponin
Agr. Biol. Chem. 37 , 225 - 231 (1973)

SAUVAIRE,Y. und J.C. BACCOU : Obtaining diosgenin,(25) - spirost - 5 - en - 3β - ol;problems of the acid hydrolysis of the saponins
Lloydia 41 , 247 - 256 (1978)

SCHLENK,W. : Über aliphatische Harnstoff - Addukte,eine neue Kategorie von Additionsverbindungen
Angew. Chem. 61 , 447 (1949)

SCHRALL,R. : Untersuchungen zum Wachstum und zur Sekundärstoffproduktion von Callus- und Suspensionskulturen der Arzneipflanzen Valeriana wallichii,Silybum marianum,Crataegus monogyna und C. oxyacantha, Gingko biloba,Bryonia alba und B. dioica
Dissertation,Heidelberg 1977

SCHREIBER,K. und G. OSSKE : Isolierung von Cycloartenol aus Blättern der Kulturkartoffel Solanum tuberosum L.. Sterine und Triterpenoide II. Mitteilung

Kulturpflanze 10 , 372 - 381 (1962)

SCHREIBER,K. und H RIPPERGER : Solanum alkaloids LXXVIII. Jurubine,a novel Type of steroidal saponin with (25 S) - 3β - amino - 5α - furostane - 22α,26 - diol - O (26) - β - D - glucopyranoside structure from Solanum paniculatum
Tetrahedron Letters 48 , 5997 - 6002 (1966)

SCHREIBER,K. und H. RÖNSCH : Neuere Untersuchungen zur Chemie und Biochemie der Alkaloide von Solanum dulcamara L..
Abhandl. Dt. Akad. Wiss. Berlin,Kl. Chemie, Geol.,Biol. 4 , 395 (1963)

SCHREIBER,K. und H. RÖNSCH : Die Steroidalkaloide und -sapogenine chemisch unterschiedlicher Sippen von Solanum dulcamara L..LIII. Mitt.: Solanum - Alkaloide
Arch. Pharm. 298 , 285 - 293 (1965)

SHEWRY,P.R. und A.K. STOBART : Effect of gibberellic acid on sterol production in Corylus avellana seeds
Phytochemistry 13 , 347 - 355 (1974)

SPITELLER,G. : Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen
Verlag Chemie,Weinheim 1966

STABA,E.J. : Plant tissue culture as a technique for the phytochemist
Rec. Adv. Phytochem. 2 , 73 - 106 (1969)

STABA,E.J. : Tissue culture and pharmacy
in : REINERT,J. und Y.P S BAJAJ (eds.) : Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture

Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1977

STABA,E.J.,P. LAURSEN und S. BUCHNER : Medicinal plant tissue cultures
in : WHITE,P.R. und A.R. GROVE (eds.) : Proc. Intern.Conf. Plant tissue Culture,pp.191 - 210
McCutchan Publ.,Berkeley,California 1965

STECK,W. und F. CONSTABEL : Biotransformation in plant cell cultures
Lloydia 37 , 185 - 191 (1974)

STEINEGGER,E. und R. HÄNSEL : Lehrbuch der Pharmakognosie auf phytochemischer Grundlage
Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1972

STEVENS,R.G. und R. HARDMAN : Steroid studies with tissue cultures of Trigonella foenum - graecum L. using GLC
3rd Intern. Congr. Plant Tissue and Cell Culture Abstr. 75 Leicester : Univ. Leicester 1974

STOHS,S.J. : Metabolism of steroids in plant tissue cultures
in : BARZ,W.,E. REINHARD und M.H. ZENK (eds.) : Plant tissue culture and its bio - technical application,pp. 142 - 150 (1977)
Springer - Verlag Berlin,Heidelberg,New York

STOHS,S.J.,B. KAUL und E.J. STABA : The metabolism of ^{14}C - cholesterol by Dioscorea deltoidea suspension cultures
Phytochemistry 8 , 1679 - 1686 (1969)

STOHS,S.J. und R. ROSENBERG : Steroids and steroid metabolism in plant tissue cultures
Lloydia 38 , 181 - 194 (1975)

STOHS,S.J.,H. ROSENBERG und St. BILLETS : Sterols of Yucca glauca tissue cultures and seeds
Planta med. 27 , 257 - 261 (1975 a)

STOHS,S.J.,J.J. SABATKA,J.J. OBRIST und H. ROSENBERG : Sapogenins of Yucca glauca tissue cultures
Lloydia 37 , 504 - 505 (1974)

STOHS,S.J. und E.J. STABA : Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures IV. Biotransformation of Digitoxigenin and related substances
J. Pharm. Sci. 54 , 56 - 58 (1964)

STOHS,S.J.,C.L. WEGENER und H. ROSENBERG : Steroids and sapogenins tissue cultures of Dioscorea deltoidea
Planta med. 28 , 101 - 105 (1975 b)

STREET,H.E. (ed.) : Plant tissue and cell culture
Blackwell Scientific Publ.,Oxford 1973

SUPNIEWSKA,J.H. und B. DOHNAL : Tissue culture of Solanum laciniatum ait..Part I
Dissert. Pharm.Pharmacol. XXIV , 187 - 192 (1972 a)

SUPNIEWSKA,J.H. und B. DOHNAL : Tissue culture of Solanum laciniatum ait..Part II : Analysis of some compounds biosynthesized in vitro
Dissert. Pharm. Pharmacol. XXIV , 193 - 203 (1972 b)

SYHORA,K.,Z. CEKAN,S. HERMANEK und J. TROJANEK : Über die Isolierung der Alkaloide vom Solasodan - Typ aus Solanaceen
Planta med. 10 , 318 - 326 (1962)

TABATA,M.,H. YAMAMOTO und N. HIRAOKA : Alkaloid production in the tissue cultures of some Solanaceous plants

Coll. Intern. du CNRS 193 , 389 - 402 (1971)

TAKEBE,I.,G. LABIB und G. MELCHERS : Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco
Naturwissenschaften 58 , 318 - 320 (1971)

TARNG,C.S. und S.J. STOHS : An phytochemical investigation of Corchorus olitorius and C. capsularis tissue cultures
Planta med. 27 , 77 - 82 (1975)

TATTRIE,N.H. und I.A. VELIKY : Fatty acid composition of lipids in various plant cell cultures
Can. J. Bot. 51 , 513 - 516 (1973)

TEUSCHER,E. : Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe mit Hilfe von Zellkulturen
Pharmazie 28 , 6 - 18 (1973)

TOMITA,Y. und A. UOMORI : Structure and biosynthesis of prototokoronin in tissue cultures of Dioscorea tokoro
Phytochemistry 13 , 729 - 733 (1974)

TOMITA,Y.,A. UOMORI und H. MINATO : Steroidal sapogenins and sterols in tissue cultures of Dioscorea tokoro
Phytochemistry 9 , 111 - 114 (1970)

TSCHESCHE,R.,G. LÜDKE und G. WULFF : Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette.II. Sarsaparillosid, ein bisdesmosidisches 22 - Hydroxy - Furostanolsaponin

Chem. Ber. 102 , 1253 - 1269 (1969)

TSCHESCHE,R.,B.T. TJOA,G. WULFF und R.V. NORONHA : Steroidsaponine mit mehr als einer Zuckerkette.III. Convallamarosid,ein weiteres 22 - Hydroxy - Furostanolsaponin
Tetrahedron Letters 49 , 5141 - 5144 (1968)

TSCHESCHE,R. und G. WULFF : Chemie und Biologie der Saponine in : L. ZECHMEISTER (Hrsg.) : Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe,Bd. 30,S. 461
Springer Verlag Wien - New York 1973

TULECKE,W. und L.G. NICKELL : Production of large amounts of plant tissue by submerged culture
Science 130 , 863 - 864 (1959)

VAGUJFALVI,D.,G. HELD und P. TETENYI : Basische und neutrale Steroidsapogenine in Solanum - Arten
Arch. Pharm. 299 , 812 - 815 (1966)

VAGUJFALVI,D.,M. MAROTI und P. TETENYI : Presence of diosgenin and absence of solasodine in tissue cultures of Solanum laciniatum
Phytochemistry 10 , 1389 - 1390 (1971)

VARDI,A.,P. SPIEGEL - ROY und E. GALUN : Citrus cell culture - isolation of protoplasts,plating densities, effects of mutagens and regeneration of embryos
Plant Sci. Letters 4 , 231 - 236 (1975)

VROMAN,H.E. und C.F. COHEN : Separation of sterol acetates by column and thin - layer argentation chromatography
J. Lipid Res. 8 , 150 - 152 (1967)

WAGNER,H. und P.POHL : Zur Analytik von Polyenfettsäuren II.
Biochem. Z. 340 , 337 - 344 (1964)

WAHL,J. : Fermentation von pflanzlichen Zellkulturen und 12β - Hydroxylierung von β - Methyldigitoxin durch Zellkulturen von Digitalis lanata Dissertation,Tübingen 1977

WALDI,D. : DC einiger Zucker und Zuckeralkohole J. Chromatography 18 , 417 - 418 (1965)

WALL,M.E.,C.R. EDDY,M.L. McCLENNAN und M.E. KLUMPP SCOTT : Detection and estimation of steroidal sapogenins in plant tissue Analyt. Chem. 24 , 1337 - 1341 (1952)

WALL,M.E. und E.C. KELLEY : Determination and nature of leaf sterols Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 19 , 677 - 683 (1947)

WANG,C.J. und E.J. STABA : Peppermint and spearmint tissue culture II;dual - carboy culture of spearmint tissues J. Pharm. Sci. 52 , 1058 - 1062 (1963)

WEETE,J.D. : Total fatty acids of habituated and teratoma tissue cultures of tobacco Lipids 6 , 684 - 685 (1971)

WERNICKE,W. und H.W. KOHLENBACH : Versuche zur Kultur isolierter Mikrosporen von Nicotiana und Hyoscyamus Z. Pflanzenphysiol. 81 , 330 - 340 (1977)

WHITE,Ph.R. : Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient Amer. J. Bot. 26 , 59 - 64 (1939)

WILLIAMS,B.L. und T.W. GOODWIN : The terpenoids of tissue cultures of Paul's scarlet rose Phytochemistry 4 , 81 - 88 (1965)

WILLUHN,G. : Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L.;I. Genetische Fixierung der unterschiedlichen Steroidalkaloidführung
Planta med. 14 , 408 - 420 (1966)

WILLUHN,G. : Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L.;II. Der Steroidgehalt in Früchten verschiedener Entwicklungsstadien der Tomatidenol - und Soladulcidin - Sippe
Planta med. 15 , 58 - 73 (1967)

WILLUHN,G. : Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L.;III. Der Steroidalkaloidgehalt in Früchten der Solasodin - Sippe
Planta med. 16 , 462 - 466 (1968)

WILLUHN,G. : Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L.;IV. Zur Frage der Einwanderung von Steroidalkaloiden aus den Blättern in die Früchte
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82 , 657 - 663 (1970)

WILLUHN,G. : Einige Aspekte der Biosynthese und des Stoffwechsels von Steroiden in Pflanzen
Pharm. Zt. 121 , 1491 - 1501 (1976)

WILLUHN,G. und J. KÖSTENS : Solanum dulcamara L.:Triterpenoide und Sterine aus dem Petrolätherextrakt der Blätter
Planta med. 25 , 115 - 137 (1974)

WILLUHN,G. und J. KÖSTENS : Die quantitative Verteilung der Sterine und Sterinderivate in Organen von Solanum dulcamara
Phytochemistry 14 , 2055 - 2058 (1975)

WILLUHN,G. und J. KÖSTENS : Vergleichende Untersuchung der Sterine aus den Blättern der drei Steroidalkaloid-Sippen von Solanum dulcamara
Herb. Hung. 15 , 19 - 22 (1976)

WILLUHN,G. und A. KUN - ANAKE : Untersuchungen zur chemischen Differenzierung bei Solanum dulcamara L. V.Isolierung von Tomatidin aus Wurzeln der Solasodin - Sippe
Planta med. 18 , 354 - 360 (1970)

WILLUHN,G. und A. LIEBAU : Wasserlösliche Sterinkomplexe in Blättern von Solanum dulcamara
Planta med. 30 , 63 - 65 (1976)

WYLLIE,S.C. und C. DJERASSI : Mass spectrometry in structural and stereochemical problems CXLVI.Mass spectrometric fragmentation typical of sterols with unsaturated side chains
J. Org. Chem. 33 , 305 - 313 (1968)

YOSHIKAWA,T. und T. FURUYA : Purification and properties of sterol : UDPG - glucosyltransferase in cell cultures of Digitalis purpurea
Phytochemistry 18 , 239 - 241 (1979)

YU,P.L.C.,M.M. EL - OLEMY und S.J. STOHS : A phytochemical investigation of Withania somnifera tissue cultures
Lloydia 37 , 593 - 597 (1974)

ZENK,M.H. : Phytohormones and gene activity
Ber. Deut. Bot. Ges. 83 , 325 - 344 (1971)

ZENK,M.H.,H. El - SHAGI,H. ARENS,J. STÖCKIGT,E.W. WEILER und B. DEUS : Formation of the indole alkaloids

Serpentine and Ajmalicine in cell suspension cultures of Catharanthus roseus
in : BARZ,W.,E. REINHARD und M.H. ZENK : Plant tissue culture and its bio - technical application,pp. 27 - 43 (1977)
Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York

ZENK,M.H.,H. EL - SHAGI und U. SCHULTE : Anthraquinone production by cell suspension cultures of Morinda citrifolia
Planta med. Suppl. 1975 , 79 - 101

ZENKTELER,M. : In vitro development of embryos and seedlings from pollen grains of Solanum dulcamara
Z. Pflanzenphysiol. 69 , 189 - 192 (1973)

Lebenslauf

Sibylle Judith Barbara May,geboren am 15. August 1946 als Tochter des Assistenzarztes Dr.med. Gerhard May und seiner Ehefrau Dr.iur. Barbara May,geb. Liebrecht,in Siegen/Westf.. 1950 Übersiedlung von Hilchenbach nach Marburg/Lahn,dort Besuch der Volksschule von 1952 - 1956.Von 1956 - 1957 Besuch des altsprachlichen Gymnasium Philippinum .Herbst 1957 Übersiedlung nach Frankfurt a.M..Dort Besuch des altsprachlichen Lessing - Gymnasiums von 1957 - 1966 und Abitur am 2. November 1966.
Immatrikulation für das Fach Biologie zum SS 1967 an der J.W. Goethe - Universität in Frankfurt a.M..April 1970 Diplom - Vorprüfung,Juli 1972 Diplom - Hauptprüfung im Fach Biologie mit Hauptfach Botanik und den Nebenfächern Zoologie und Organische Chemie.August 1972 - Dezember 1973 Anfertigung der Diplom - Arbeit unter Anleitung von Herrn Professor Dr.H.W. Kohlenbach (Thema : Versuche zur Isolierung und Kultivierung pflanzlicher Protoplasten).Dezember 1973 Verleihung des Grades "Diplom - Biologe".
April 1974 Beginn der Promotionsarbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr.G. Willuhn im Pharmakognostischen Institut der J.W.Goethe - Universität.
März 1973 - Juli 1976 Wissenschaftliche Hilfskraft zunächst im Botanischen,dann im Pharmakognostischen Institut.August 1976 - März 1977 Wissenschaftliche Angestellte im Pharmakognostischen Institut.
Im März 1977 folgte ich Herrn Professor Dr.G. Willuhn an die Universität Düsseldorf und bin seitdem als Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmazeutische Biologie tätig, wo ich auch meine Promotionsarbeit beendete.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Doiwa,Döhler,Egle,Fiedler,Hilgenberg,Kohlenbach,Kranz,Lindauer, Lötschert,Martiensen,Pfleiderer,Ried,Rietschel,Rosenmund,Rosenstock,Royen,Willuhn und Ziegler.

Druck: dipa-Verlag, 6 Frankfurt/Main, Tel.: 55 61 88